UNIVERSITATEA „ALEXANDRU IOAN CUZA" IAŞI
FACULTATEA DE FIZICĂ

ALEXANDRU VLAHOVICI

METODE OPTICE ŞI SPECTRALE DE ANALIZĂ

EDITURA UNIVERSITĂŢII  „ALEXANDRU IOAN CUZA"

UNIVERSITATEA „AL. I. CUZA" IAŞI
FACULTATEA DE FIZICĂ

ALEXANDRU VLAHOVICI

METODE OPTICE ŞI SPECTRALE DE ANALIZĂ



EDITURA UNIVERSITĂŢII „AL. I. CUZA"
IAŞI – 2002

Referenţi:
Prof. dr. M. Strat
Lect. dr. D. Creangă

Tehnoredactare computerizată:
Foca Florin

Cuprins.

Partea a doua. Metode spectrale de analiză.

Prefață

Acest manual se adresează în primul rând studenților de la secțiile de Biofizică și Fizică medicală, de la Facultatea de Fizică, constituind, cu unele completări, cursul de metode optice și spectrometrice de analiză predat acestor studenți.

Din multitudinea metodelor optice și spectrale de analiză am prezentat doar câteva dintre ele, cele mai cunoscute și mai utilizate în diverse laboratoare fizico-chimice. Alegerea acestor metode am făcut-o și în funcție de dotarea laboratoarelor facultății, deoarece disciplina la care se adresează această carte prevede și lucrări practice. În acest sens, la sfârșitul fiecărui capitol, am prezentat unele probleme practice de laborator, fără pretenția de a fi referate propriu-zise.

Desigur că în lucrare se dau doar informații generale despre unele metode de analiză, prezentându-se și unele considerații teoretice despre fenomenul fizic ce stă la baza fiecărei metode. Pentru efectuarea practică a analizelor este nevoie de o documentare suplimentară. În acest sens cel interesat găsește la bibliografia lucrării tratatele existente la Biblioteca Centrală a Universității.

Consider că această carte va fi utilă nu numai studenților de la secțiile de Biofizică și Fizică Medicală ci și tuturor celor interesați de metode optice și spectrale de analiză, măcar pentru informare generală.

Partea întâi. Metode optice de analiză.

Cap. I. Refractometria.

I.1. Considerații generale.

Refractometria reprezintă o metodă de analiză bazată pe măsurarea indicelui de refracție al unei substanțe sau amestecuri de substanțe, de preferință când acestea se află în starea lichidă sau gazoasă. Această metodă se utilizează în practica diverselor laboratoare uzinale sau de cercetare încă din secolul trecut. Ea și-a păstrat actualitatea și în prezent ca metodă de analiză a amestecurilor, de studiu a structurii moleculare și interacțiunilor moleculare în diverse sisteme chimice și biologice.

Indicele de refracție al unei substanțe depinde de o serie de factori cum ar fi: starea sa de agregare, temperatură, presiune (în cazul gazelor), lungimea de undă a radiațiilor utilizate etc.

De obicei indicii de refracție se determină pentru următoarele lungimi de undă:

- linia galbenă a sodiului (linia D); $\lambda_D = 589{,}3\,nm \;\; (n_D)$,
- linia roșie a hidrogenului (H_α, notată uneori și cu C); $\lambda_\alpha = 656{,}3\,nm \;\; (n_\alpha)$,
- linia albastră-violet a hidrogenului (H_β, notată uneori și cu F); $\lambda_\beta = 486{,}1\,nm \;\; (n_\beta)$,
- linia violet-indigo a hidrogenului (H_γ notată uneori și cu G); $\lambda_\gamma = 434{,}1\,nm \;\; (n_\gamma)$.

În diverse tabele se găsesc, pentru lichide, mai ales indicii de refracție pentru radiația D și temperatura de 20^0C : n_D^{20}. În cazul gazelor indicii sunt dați pentru condițiile normale de presiune și temperatură (p=760 mmHg, $t = 0^0C$) : n_D^{NPT}.

În cazul apei, cel mai important lichid biologic, indicele de refracție variază destul de mult cu temperatura (avându-se în vedere

precizia mare cu care poate fi el măsurat) conform tabelului 1.

Tabelul 1. Indicele de refracţie al apei distilate (n_D)la diverse temperaturi.

$t(^0C)$	n_D	$t(^0C)$	n_D
10	1,33370	21	1,33291
11	1,33364	22	1,33282
12	1,33358	23	1,33272
13	1,33352	24	1,33262
14	1,33346	25	1,33252
15	1,33339	26	1,33242
16	1,33331	27	1,33231
17	1,33324	28	1,33220
18	1,33316	29	1,33208
19	1,33308	30	1,33196
20	1,33300		

Lichidele biologice au indicele de refracţie mai mare decât cel al apei. De exemplu indicele de refracţie al serului sanguin, la temperatura de $17,5^0C$, este cuprins, în condiţii normale, între 1,3487 şi 1,3517, în cazul urinei între 1,3300 şi 1,3400.

Deoarece indicele de refracţie al unei substanţe variază foarte mult în funcţie de densitatea ρ a acesteia (densitate ce depinde de starea de agregare a substanţei şi de temperatură) s-a introdus mărimea fizică numită refracţie molară (R), mărime ce depinde de n şi ρ dar păstrează o valoare constantă pentru un anumit compus chimic, independentă de temperatură şi de starea de agregare a acesteia.

Cea mai des utilizată formulă pentru refracţia molară este cea dedusă de Lorentz-Lorentz:

$$R = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2}\frac{M}{\rho},$$

M fiind masa molară a compusului.

În teoria dielectricilor se arată că refracţia molară este aproximativ egală cu volumul real ocupat cu moleculele dintr-un mol.

Deoarece se poate considera că volumul unei molecule este suma volumelor atomilor constituenţi, acestora li se pot atribui refracţii atomice caracteristice, din a căror însumare rezultă refracţia molară.

Din valorile experimentale ale refracţiilor molare ale diverşilor compuşi (s-a plecat de la cei mai simpli la care s-au adăugat diverşi atomi sau grupuri de atomi) s-au determinat refracţiile atomice pentru diferiţi atomi (vezi tabelul 2). S-a constatat că refracţiile atomice depind în unele cazuri şi de modul de legare al acelui atom în moleculă; de exemplu pentru refracţia atomului de oxigen există trei valori: pentru oxigenul carbonilic $O=$ (din aldehide, cetone, acizi), hidroxilic $-O-$ (din alcooli) şi eteric $O_{<}$ (din eteri). S-a mai constatat că în cazul existenţei unor duble şi triple legături, la refracţia molară, calculată prin însumarea refracţiilor atomice, trebuie adăugat un aşa-numit increment de refracţie.

Tabelul 2. Refracţii atomice şi incrementele de refracţie, în cm^3.

Atomul sau legătura	R_α $\lambda = 656{,}3nm$	R_D $\lambda = 589{,}3nm$	R_β $\lambda = 486{,}1nm$	R_γ $\lambda = 434{,}1nm$
C	2,413	2,418	2,438	2,466
H	1,092	1,100	1,115	1,122
$O=$	2,189	2,211	2,247	2,267
$-O-$ (hidroxil)	1,522	1,525	1,531	1,541
$O_{<}$ (eteri)	1,639	1,643	1,649	1,662
F	0,984	0,997	1,011	1,024
Cl	5,933	5,967	6,043	6,101
Br	8,803	8,865	8,999	9,152
I	15,757	13,900	14,224	14,520
=:leg.dublă	1,686	1,733	1,824	1,893
≡:leg.triplă	2,328	2,398	2,506	2,538
$N-(C)$	2,309	2,322	2,368	2,397
$(C)-N_{(C)}^{(C)}$	2,807	2,840	2,940	3,000
$N\equiv(C)$	3,054	3,070	3,108	3,129
$-S-$	7,630	7,690	7,830	7,980

Alături de refracțiile atomice se utilizează și așa-numitele refracții de legătură. Aceste refracții, spre deosebire de primele, oglindesc interacțiunile dintre atomi și legăturile lor și conțin astfel unele incremente din sistemul refracțiilor atomice. Refracția unei legături $A-X$ a fost dedusă din refracția compusului AX_n, împărțind-o la n. Astfel, refracția legăturii $C-H(R_{C-H})$ a rezultat divizând refracția metanului $R_{CH_4}=6{,}60cm^3$ prin 4, adică: $R_{C-H}=\frac{6{,}60}{4}=1{,}60cm^3$. Plecând de la hidrocarburi superioare se obține valoarea preferabilă: $R_{C-H}=1{,}676cm^3$.

Refracțiile de legătură ale compușilor organici sunt date în tabelul 3.

Tabelul 3 . Refracții de legătură ale compușilor organici.

Legătura	R_D, cm^3	Legătura	R_D, cm^3
$C-H$	1,676	$C-O$ metilcetone	3,49
$C-C$	1,296	$C-S$	4,61
$C-C$ în ciclopropan	1,50	$C=S$	11,91
$C-C$ în ciclobutan	1,38	$C-N$	1,57
$C-C$ în ciclopentan	1,26	$C=N$	3,75
$C-C$ în ciclohexan	1,27	$C\equiv N$	4,82
$C-C$ aromatic	2,69	$N-N$	1,99
$C=C$	4,17	$O-H$ în alcooli	1,66
$C\equiv C$	5,87	$O-H$ în acizi	1,80
$C-F$	1,55	$S-H$	4,80
$C-Cl$	6,51	$S-S$	8,11
$C-Br$	9,39	$S-O$	4,91
$C-I$	14,61	$N-H$	1,76
$C-O$ în eteri	1,54	$N-O$	3,43
$C-O$ în acetali	1,46	$N=O$	4,00
$C=O$	3,32	$N=N$	4,12

Utilizând datele din tabelele 2 sau 3 se pot calcula refracțiile

molare ale diverşilor compuşi organici, valorile astfel obţinute trebuind să fie egale sau apropiate de cele măsurate experimental. Este deci posibilă determinarea refracţiilor combinaţiilor complexe fără a efectua măsurători experimentale, fapt deosebit de important în aplicaţiile practice ale refractometriei.

I.2. Procedee de bază în analiza refractometrică.

Aditivitatea refracţiilor atomice şi de legătură este utilizată în chimia organică ca metodă simplă şi eficace pentru verificarea formulelor de structură.

Prin metoda refractometrică nu se poate face însă o analiză calitativă sigură a substanţelor, adică de a stabili natura lor (formula lor chimică) doar pe baza comparării refracţiilor măsurate cu valorile refracţiilor, tabelate, ale diverşilor compuşi chimici. Refractometria este utilizată însă cu succes la analiza cantitativă a unor amestecuri de lichide organice a căror refracţii molare sunt cunoscute. Metoda se bazează pe faptul că refracţia molară a unui amestec, în care interacţiunile moleculare sunt neglijabile, se compune aditiv din suma refracţiilor molare ale componentelor amestecului. În locul refracţiei molare este de preferat, în acest caz, refracţia specifică R':

$$R' = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2}\frac{1}{\rho},$$

care se bucură de aceeaşi proprietate, prezentând însă avantajul că este accesibilă măsurătorilor experimentale deoarece în relaţia de definiţie lipseşte masa molară.

În cazul unui amestec format din n componente, de refracţii specifice $R_1', R_2', ..., R_n'$, fracţiile molare corespunzătoare fiind x_1, $x_2, ..., x_n$, vom avea:

$$x_1 R_1' + x_2 R_2' + ... + x_n R_n' = R',$$

$$x_1 + x_2 + ... + x_n = 1,$$

R' fiind refracţia specifică a amestecului, determinată experimental.
Din cele două ecuaţii de mai sus se pot deduce două din fracţiile molare dacă cele n refracţii specifice şi $n - 2$ fracţii molare sunt cunoscute.

Pentru un amestec binar vom avea următoarele ecuații:

$$x_1 R_1^{'} + x_2 R_2^{'} = R^{'},$$

$$x_1 + x_2 = 1,$$

din care rezultă : $x_1 = \frac{R^{'} - R_2^{'}}{R_1^{'} - R_2^{'}}$, $x_2 = \frac{R_1^{'} - R^{'}}{R_1^{'} - R_2^{'}}$.

Cunoscând refracțiile specifice $R_1^{'}$ și $R_2^{'}$ și măsurând refracția specifică $R^{'}$ a amestecului se poate face analiza cantitativă a acestuia.

Când nu se cunosc cele $n-2$ refracții molare ale unui amestec cu n componente, pentru a obține numărul necesar de ecuații se fac măsurători de indici de refracție la mai multe lungimi de undă.

În cazul soluțiilor binare cum ar fi soluțiile apoase de alcool, zahăr, acizi, săruri etc. se aplică de obicei metoda curbei de etalonare care se construiește în coordonatele: indice de refracție-concentrația soluției.

Analiza pe o cale asemănătoare a soluțiilor ternare e mai complicată deoarece în paralel cu determinarea indicelui de refracție este necesar de a determina încă o proprietate a sistemului: densitate, vâscozitate etc. O largă răspândire o are metoda refracto-densitometrică, bazată pe măsurarea indicelui de refracție și a densității. Analiza conform acestei metode prevede construirea diagramei triunghiulare a componentelor, pe care se introduc datele experimentale pentru soluțiile standard, pentru liniile cu același indice de refracție și liniile cu aceeași densitate. Indicele de refracție și densitatea soluției analizate se introduc în triunghiul compozițiilor pentru a găsi punctul ce corespunde acestor mărimi. Coordonatele acestui punct vor indica direct compoziția soluției analizate. În prezent cu ajutorul acestei metode sunt studiate zeci de sisteme ternare, cum ar fi: metanol-etanol-apă, metanol-etanol-acetonă etc.

I.3. Probleme practice de laborator.

a)Determinarea refracțiilor molare ale apei, alcoolului etilic și acidului acetic utilizând datele din tabelele 2 și 3 și compararea lor cu valorile experimentale.

Refracțiile molare ale celor trei compuși se calculează astfel:

Apă H—O—H

După tabelul 2: $R_{apa} = 2R_H + R_{-O-} = 3{,}725\,cm^3$.

După tabelul 3: $R_{apa} = 2R_{O-H \text{ in acizi}} = 3{,}600\,cm^3$.

Alcool etilic $H-CH_2-CH_2-OH$ (H–C(H)(H)–C(H)(H)–OH)

După tabelul 2: $R_{alc} = 6R_H + 2R_C + R_{-O-} = 12{,}961\,cm^3$.

După tabelul 3:

$R_{alc} = 5R_{C-H} + R_{C-C} + R_{C-O \text{ in acetali}} + R_{O-H \text{ in alcooli}} = 12{,}796\,cm^3$.

Acid acetic H–C(H)(H)–C(=O)–OH

După tabelul 2: $R_{acid} = 4R_H + 2R_C + R_{O=} + R_{-O-} = 12{,}976\,cm^3$.

După tabelul 3:

$R_{acid} = 3R_{C-H} + R_{C-C} + R_{C=O} + R_{C-O \text{ in acetali}} + R_{O-H \text{ in acizi}} = 12{,}904\,cm^3$.

Determinările de indici de refracție se vor face cu ajutorul refractometrului Abbe la 20^0C. Pentru realizarea acestei temperaturi carcasa în care sunt montate prismele de măsură se va cupla la un termostat. Densitățile se vor scoate din tabele.

b) Determinarea concentrației proteinelor din serul sangvin.

Principala aplicație a refractometriei în laboratorul clinic se bazează pe observația după care indicele de refracție al serului depinde de concentrația sa în proteine. Metoda se aplică și pentru exsudate sau transsudate, adică pentru proteinele din salivă și urină. Determinările se pot face rapid dacă se utilizează tabelul 4 în care se prezintă valorile indicelui de refracție n_D, măsurat la $17{,}5^0C$ $\left(n_D^{17.5}\right)$ în funcție de concentrația proteinelor.

Tabelul 4. Indicele de refracţie în funcţie de concentraţia proteinelor pentru $t = 17{,}5^0 C$.

Concentraţia proteinelor serice $(g\,^0/_{00})$	Concentraţia proteinelor din exsudate sau transsudate $(g\,^0/_{00})$	$n_D^{17.5}$	Concentraţia proteinelor serice $(g\,^0/_{00})$	Concentraţia proteinelor din exsudate sau transsudate $(g\,^0/_{00})$	$n_D^{17.5}$
6,3	7,7	1,33705	56,8	55	1,34575
8,6	9,7	1,33743	59	57	1,34612
10,8	11,8	1,33781	61,2	59	1,34650
13	13	1,33820	63,4	61,1	1,34687
15,2	15,9	1,33858	65,5	63,1	1,34724
17,4	17	1,33896	67,7	65,1	1,34761
19,6	20,1	1,33934	69,8	67,1	1,34798
21,8	22,1	1,33972	72	69,1	1,34836
24	24,2	1,34010	74,2	71,2	1,34873
26,2	26,2	1,34048	76,9	73,2	1,34910
28,4	28,3	1,34086	78,5	75,2	1,34947
30,6	30,4	1,34124	80,6	77,2	1,34984
32,8	32,4	1,34162	82,8	79,2	1,35021
35	34,5	1,34199	84,9	81,2	1,35058
37,2	36,5	1,34237	87,1	83,2	1,35095
39,4	38,6	1,34275	89,2	85,2	1,35132
41,6	40,7	1,34313	91,4	87,2	1,35169
43,8	42,7	1,34350	93,5	89,2	1,35205
46	44,8	1,34388	95,7	91,2	1,35242
48,1	46,8	1,34426	97,8	93,2	1,35279
50,3	48,9	1,34463	99,9	95,2	1,35316
52,5	51	1,34500	102	97,2	1,35352
54,7	53	1,34537	104,1	99,1	1,35388

Se va lucra cu refractometrul Abbe, termostat la $17{,}5^0 C$. Ca agent de termostatare se va utiliza apa răcită cu gheaţă.

Cap. II. Polarimetria.

II.1. Introducere.

În înțelesul mai larg polarimetria cuprinde cele trei metode de analiză ce se bazează pe fenomenul de activitate optică (adică de rotire naturală a planului de polarizare a luminii):

a) polarimetria propriu-zisă, metodă în care unghiul de rotire se măsoară de obicei pentru radiația D a sodiului sau pentru o radiație ce se află în afara benzilor de absorbție ale compușilor analizați,
b) dispersia optică rotatorie, metodă în care unghiul de rotire se măsoară pentru radiațiile din banda de absorbție a compușilor analizați,
c) dicroismul optic circular, metodă ce se bazează pe măsurarea diferenței absorbțiilor celor două componente circular polarizate ce se propagă prin mediul optic activ, măsurătorile făcându-se, ca și în cazul anterior, pentru radiații din banda de absorbție.

Activitatea optică este asociată cu două tipuri de specii:

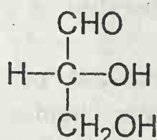
a) compuși cristalini care își pierd activitatea atunci când cristalul e transformat în lichid, gaz sau soluție,
b) compuși pentru care activitatea optică este determinată de particularitățile de structură ale moleculelor (de exemplu lipsa la ele a unui centru sau a unui plan de simetrie) și care se manifestă indiferent de starea de agregare a acestor compuși.

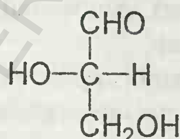
În continuare ne vom limita doar la compușii din a doua categorie, starea cea mai potrivită pentru măsurători fiind fie faza lichidă fie așa-numita fază condensată : soluția compusului într-un solvent potrivit ales.

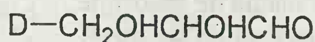
Substanțele ce rotesc planul de polarizare spre dreapta (când se privește prin ocularul polarimetrului în sens invers propagării luminii), adică în sensul acelor de ceas, se numesc dextrogire (d), unghiul de rotire considerându-se pozitiv $(+\alpha)$. Substanțele ce rotesc planul de polarizare spre stânga, adică în sens invers acelor de ceas, au fost denumite levogire

(l) unghiul de rotire considerându-se negativ $(-\alpha)$. Amestecul echimolecular de izomeri d şi l nu posedă activitate optică, el fiind denumit amestec racemic.

Înaintea, uneori după formula sau denumirea unei substanţe ce prezintă activitate optică, se pun fie literele d sau l, fie (+) sau (–). Pentru un amestec racemic se utilizează ambele litere, d şi l. De exemplu racemul acidului maleic se numeşte acid maleic dl. Literele majuscule D şi L, care se pun înaintea denumirilor sau formulelor substanţelor cu activitate optică (de obicei monozaharide, α – aminoacizi) indică apartenenţa lor la seriile sterice D- sau L- ale aldehidei glicerice, luată drept substanţă de referinţă. La seria D- se referă substanţele care pot fi obţinute din forma D- a aldehidei glicerice, iar la seria L- din forma ei L-:







(D-gliceroză)



(L-gliceroză)

Rotirea planului de polarizare se poate observa cel mai simpı, dacă substanţa optic activă este plasată între doi polarizori P şi A „în cruce" (la extincţie), sistemul fiind iluminat cu radiaţia D a sodiului. Polarizorul P, care produce lumina liniar polarizată, este fix iar analizorul A se poate roti în jurul direcţiei luminii ce traversează sistemul.

Fie OP, direcţia de transmisie a polarizorului, adică direcţia pe care o are vectorul intensitate a câmpului electric $\vec{E}_p$ în fasciculul de radiaţii ce a ieşit din polarizor (fig. 1). Planul în care oscilează vectorul $\vec{E}_p$ (planul normal pe planul figurii) a primit denumirea de plan de oscilaţie, iar planul perpendicular pe acesta, în care oscilează vectorul $\vec{B}$, se numeşte plan de polarizare. Fie OA direcţia de transmisie a analizorului. În lipsa substanţei optic active, câmpul radiaţiilor ce ies din

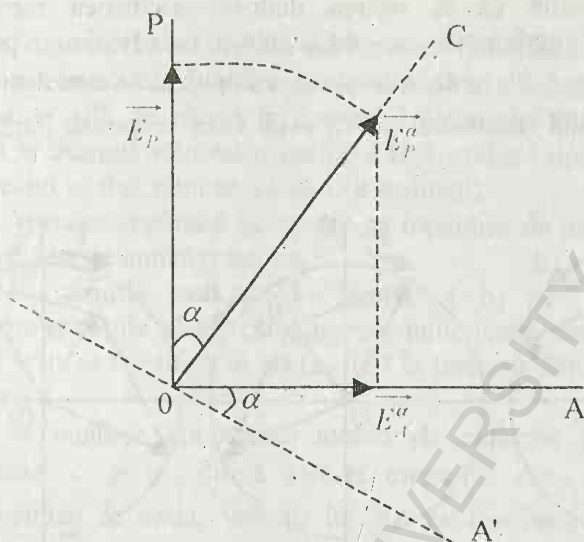


Fig.1. Polarizor şi analizor "în cruce" (la extincţie)

analizor va fi întunecat, proiecţia lui $\vec{E_P}$ pe direcţia lui OA fiind nulă. În urma rotirii planului de polarizare de către substanţa optic activă cu unghiul α, direcţia de oscilaţie a câmpului electric se roteşte şi ea cu acelaşi unghi. În acest caz câmpul radiaţiilor ce ies din analizor va deveni luminos datorită componentei $\vec{E_A^\alpha}$. Pentru a restabili extincţia (câmp întunecat) analizorul trebuie să fie rotit cu un acelaşi unghi α, unghi ce poate fi măsurat.

Explicarea generală a rotirii planului de polarizare aparţine lui Fresnel. Acesta a plecat de la faptul cunoscut după care o radiaţie liniar polarizată se poate descompune în două radiaţii coerente circular polarizate, una de tip d (cu sens de rotaţie dextrogir) şi alta de tip l (cu sens de rotaţie levogir). Vectorii „luminoşi" (vectorii $\vec{E}$) ai celor două tipuri de radiaţii, de amplitudine jumătate din acela al radiaţiei iniţiale, se rotesc cu frecvenţe egale cu frecvenţa luminii.

În medii optic inactive cele două componente l şi d (ne referim la câmpul electric $\vec{E}$ al undei electromagnetice) se propagă riguros cu

aceeaşi viteză astfel că la ieşirea dintr-un asemenea mediu, prin compunerea lor (interferenţă), se obţine tot o radiaţie liniar polarizată: fig. 2 a). Deoarece în unda luminoasă câmpul $\vec{E}$ variază sinusoidal, evident că modulul rezultantei $\vec{R}$ va avea valori cuprinse între E_{max} şi E_{min}.

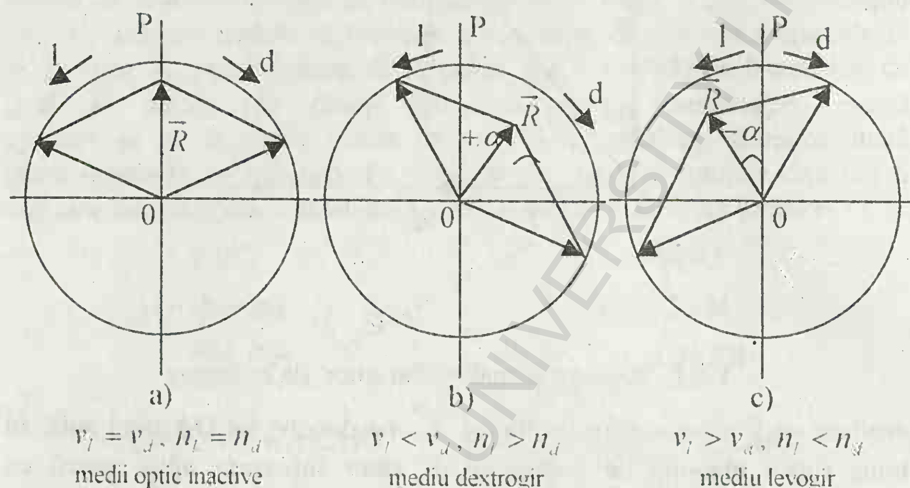


Fig. 2. Recompunerea luminii liniar polarizate din componentele l şi d în cazul mediilor optic inactive (a), în cazul unui mediu dextrogir (b) şi a unuia levogir (c)

Într-un mediu optic activ vitezele v_l şi v_d a celor două componente, respectiv indicii de refracţie n_l şi n_d ai mediului pentru cele două componente, pot să difere astfel că rezultanta $\vec{R}$ va fi rotită faţă de direcţia iniţială OP. Cazul substanţelor dextrogire este prezentat în fig. 2 b) iar a celor levogire în fig. 2 c).

Fresnel a dedus pentru unghiul α de rotire a planului de polarizare formula:

(1) $$\alpha = \frac{\pi}{\lambda}(n_l - n_d)l \text{ (rad.)},$$

unde λ este lungimea de undă a radiaţiilor iar l grosimea stratului

absorbant.

Formula (1) se verifică doar pentru radiaţiile a căror lungime de undă λ nu este situată în banda de absorbţie a substanţei optic active, bandă ce se află de obicei în domeniul ultraviolet (trebuie precizat, de altfel, că la început activitatea optică a fost studiată doar pentru radiaţiile din domeniul vizibil, cum ar fi linia D a sodiului).

Variaţia unghiului de rotaţie cu lungimea de undă a radiaţiilor se numeşte dispersie optică rotatorie.

În cazurile analizate în figurile 2 b) şi 2 c) s-au luat în considerare situaţiile ideale când amplitudinile componentelor l şi d nu se modifică (sau se modifică în acelaşi fel) la trecerea radiaţiilor prin mediul optic activ.

În realitate coeficienţii molari de extincţie pentru cele două componente, ε_l şi ε_d, diferă între ei, diferenţa: $\Delta\varepsilon = \varepsilon_l - \varepsilon_d$ depinzând şi de lungimea de undă. Variaţia lui $\Delta\varepsilon$ cu lungimea de undă a primit denumirea de dicroism optic circular.

Datorită absorbţiei diferite a celor două componente circular polarizate, se vor modifica şi amplitudinile lor astfel că prin compunerea lor, la ieşirea din mediul optic activ, nu se va mai obţine o radiaţie liniar polarizată ci una eliptic polarizată, unghiul α de rotire „a planului de polarizare" va fi de data aceasta unghiul dintre direcţia OP şi axa mare OB a elipsei. În fig. 3 este prezentată, pentru ilustrare, situaţia când $\varepsilon_d > \varepsilon_l$ şi $n_l > n_d$ $(v_l < v_d)$.

Se arată că între elipticitatea elipsei, θ, definită prin relaţia: $\theta = tg\, OC/OB$, şi $\Delta\varepsilon$ există o relaţie de proporţionalitate: $\theta \approx \Delta\varepsilon = \varepsilon_l - \varepsilon_d$, adică cu cât diferenţa $\Delta\varepsilon$ va fi mai mare, elipsa va fi mai puţin turtită., adică va avea elipticitate mai mare. Pentru $\varepsilon_l = \varepsilon_d$, $\theta = 0$, elipsa se transformă într-o dreaptă, ceea ce corespunde luminii liniar polarizate.

Deci pentru radiaţiile din domeniul benzii de absorbţie a substanţei optic active, radiaţii pentru care apare fenomenul de dicroism, la rotirea analizorului cu unghiul α, câmpul nu va mai fi întunecat ci va avea luminozitatea cea mai mică. Acest lucru permite măsurarea

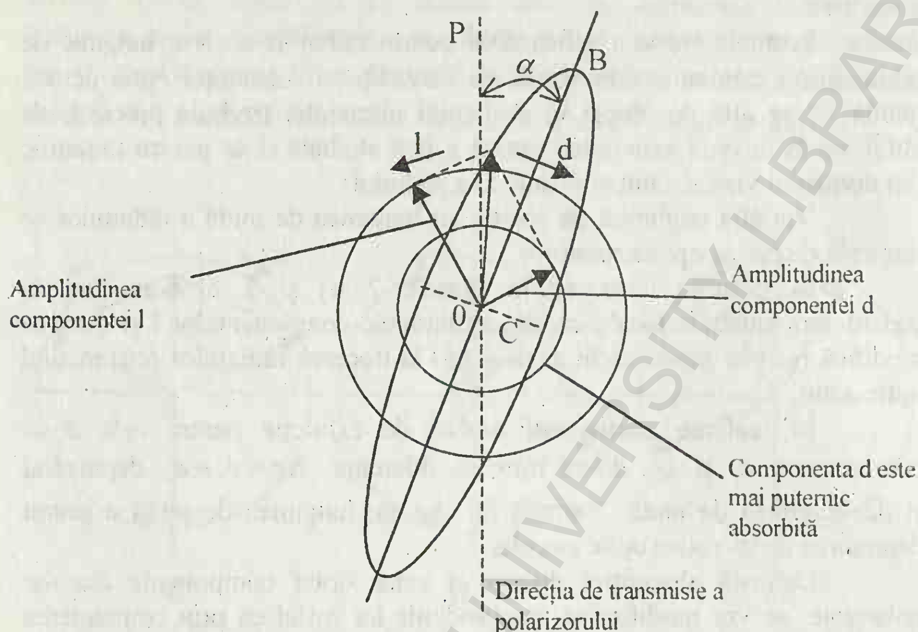


Fig. 3. Polarizarea eliptică a radiațiilor în urma traversării unui mediu optic activ pentru care $\varepsilon_d > \varepsilon_l$ și $n_e > n_d$.

unghiului α, nu însă prin metode vizuale, cum vom vedea mai jos.

Trebuie de precizat faptul că mărimea unghiului α depinde doar de diferența indicilor de refracție, conform formulei (1), și nu depinde de dicroismul optic circular. Acest fapt este deosebit de important pentru efectuarea analizelor deoarece dependențele (curbele de variație) a lui α și $\Delta\varepsilon$ în funcție de lungimea de undă a radiațiilor, vor fi independente una de alta. Aceste dependențe descriind două comportări diferite ale substanțelor optic active se vor completa una pe alta mărind precizia determinărilor. Precizia crește și prin faptul că pentru același domeniu spectral, pentru care se obțin dependențele pomenite mai sus, avem la dispoziție și curba (spectrul) de absorbție din ultraviolet și vizibil (amănunte despre spectrele electronice de absorbție: Cap. IX)

II.2. Consideraţii privind metoda polarimetrică de analiză (metodă în care se măsoară unghiul de rotire α pentru radiaţii din domeniul vizibil, de obicei pentru linia D a sodiului).

Aceasta este metoda cea mai veche pentru analiza substanţelor optic active, utilizându-se încă din secolul trecut, metodă ce se aplică cu succes şi în prezent în diverse laboratoare, în special în cazul lichidelor şi al soluţiilor.

Metoda se bazează pe legea lui Biot, după care:

(1) $$\alpha = [\alpha]_{\lambda}^{t} l \rho \ ,$$

în cazul lichidelor pure, şi:

(2) $$\alpha = [\alpha]_{\lambda}^{t} l c \ ,$$

în cazul soluţiilor.

Semnificaţia mărimilor ce intervin în (1) şi (2) este următoarea:

l = lungimea coloanei de lichid sau soluţie,
ρ = densitatea lichidului,
c = concentraţia soluţiei,
$[\alpha]_{\lambda}^{t}$ = puterea rotatorie specifică, numită şi rotaţie specifică.

În cazul lichidelor pure rotaţia specifică depinde de lungimea de undă λ a radiaţiilor şi de temperatura t. În cazul soluţiilor $[\alpha]$ depinde, pe lângă λ şi t, şi de concentraţia soluţiei cât şi de solventul utilizat.

Cu ajutorul polarimetrelor uzuale $[\alpha]$ se determină pentru radiaţia galbenă a sodiului: $[\alpha]_{D}^{t}$. Pentru substanţele optic active dextrogire semnul lui $[\alpha]$ se consideră pozitiv iar pentru cele levogire negativ.

Constanta $[\alpha]_{D}^{t}$ a substanţelor pure sau a soluţiilor acestora este una din constantele fizice de bază pentru identificarea acestora, alături de punctul de topire, de cel de fierbere, indicele de refracţie etc.

Deoarece activitatea optică este caracteristică pentru mai mulţi compuşi de interes biomedical cum ar fi proteinele, aminoacizii, steroizii, alcaloizii şi carbohidraţii, polarimetria reprezintă o metodă utilă pentru identificarea lor. În tabelul 1 se prezintă rotaţiile specifice pentru o serie

de lichide organice pure iar în tabelul 2 pentru soluțiile unor substanțe organice de interes biomedical.

Tabelul 1. Rotații specifice $[\alpha]_D^t$ pentru lichide organice pure.

Denumire	Formulă	t^0C	$[\alpha]_D^t$
Limonen	$C_{10}H_{16}$	21	115,9
(+)-Tartrat de metil	$C_6H_{10}O_3$	20	2,14
Alcool sec-octilic	$C_8H_{18}O$	20	9,84
(-)-Mentol	$C_{10}H_{20}O$	46	-49,9
(+)-Carvonă	$C_{10}H_{14}O$	18	62,93
(+)-sec-Butilamină	$C_4H_{11}N$	15	7,80
(-)-Nicotină	$C_{10}H_{14}N_2$	20	-168,6

Tabelul 2. Rotații specifice $[\alpha]_D^t$ pentru soluțiile unor substanțe organice ($p = g$ substanță în 100 g soluție; $c = g$ substanță în 100 cm^3 soluție).

Denumire	Dizolvant	Concentrație	t^0C	$[\alpha]_D^t$
Acid L-ascorbic	H_2O	$c = 3$	19	+24
d-Borneol	C_2H_5OH	$p = 2,736$	25	+25,8
Chinidină	C_2H_5OH	$c = 1$	-	+233,6
Codeină	C_2H_5OH	$p = 5$	-	-135,8
Nicotină	C_2H_5OH	$c = 21,2$	20	-30
Glucoză	H_2O	$c = 1$	20	+52,74
Fructoză	H_2O	$c = 1$	20	-93,78
Galactoză	H_2O	$c = 1$	20	+80,7
Maltoză	H_2O	$c = 1$	20	+136,90
Zaharoză	H_2O	$c = 26$	20	+66,45
Lactoză	H_2O	$c = 1$	20	+55,30
Manoză	H_2O	$c = 1$	20	+14,5

Tabelul 2, continuare.

Arabinoză	H_2O	$c=1$	20	+105
Celobioză	H_2O	$c=1$	20	+35
Xiloză	H_2O	$c=4{,}08$	13	+17,6
Rafinoză	H_2O	$c=10{,}014$	20	+123,23
Mentol	C_2H_5OH	$c=9{,}6$	-	-50,6
Acid mandelic	H_2O	$p=2{,}01$	-	+155,5
Acid (+)-lactic	H_2O	$p=10{,}05$	-	+3,8

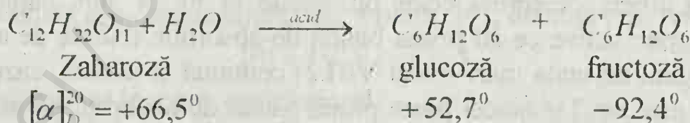
Obs. Uneori, în loc de $[\alpha]$ se utilizează aşa-numita putere rotatorie molară definită prin relaţia:

(3) $$[M]_\lambda^t = M\frac{[\alpha]_\lambda^t}{100},$$

M fiind masa molară a compusului respectiv.

<u>Analiza cantitativă</u> a compuşilor optic activi se poate face relativ simplu, utilizând metoda polarimetrică, pe baza curbelor de etalonare α_D în funcţie de concentraţie, curbe care pot fi liniare, parabolice sau hiperbolice.

Metoda polarimetrică se aplică curent în industria zahărului. Dacă, de exemplu, singurul constituent optic activ este zaharoza, concentraţia sa se poate determina din măsurători polarimetrice simple ale soluţiilor în apă ale probei, concentraţia fiind direct proporţională cu unghiul de rotire. Dacă în soluţia de măsură sunt prezenţi şi alţi compuşi optic activi atunci se recurge la hidroliza zaharozei conform ecuaţiei de mai jos, cunoscută sub denumirea de „invertire a zaharozei":



$$C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O \xrightarrow{acid} C_6H_{12}O_6 + C_6H_{12}O_6$$

Zaharoză — glucoză — fructoză

$[\alpha]_D^{20} = +66{,}5^0$ — $+52{,}7^0$ — $-92{,}4^0$

Compuşii de reacţie vor determina împreună o inversare a semnului rotaţiei. Concentraţia zaharozei va fi direct proporţională cu diferenţa celor două unghiuri de rotaţie, cel de dinaintea şi cel de după hidroliză.

II.3. Considerații privind metoda dispersiei optice rotatorii şi cea a dicroismului optic circular.

Vom analiza în paralel aceste metode deoarece ele se bazează pe interacțiunea radiației circular polarizate cu speciile optic active, utilizând nişte mărimi caracteristice acestor specii (α şi $\Delta\varepsilon$), măsurate pentru radiații din banda lor de absorbție.

Înregistrarea dispersiei optice rotatorii în domeniul uzual $250-750\,m\mu$ poate conduce la două tipuri de curbe şi anume la aşa-zisele curbe „normale" şi la curbe „anormale" care corespund efectului Cotton. Curbele normale reflectă dependența lui α (sau $[\alpha]$) de λ, conform formulei (1), în afara benzii de absorbție; ele sunt curbe fără nici un maxim sau minim, $|\alpha|$ scăzând cu creşterea lui λ. Aceste curbe sunt utilizate mai rar în scop analitic.

Curbele „anormale", mult mai utile în scopuri analitice, pot fi de două feluri şi anume:

a) curbe cu efect Cotton pozitiv - când ele trec printr-un maxim situat la lungimi de undă mai mari, după care descresc brusc spre λ mici trecând printr-un minim (fig. 4 a)),
b) curbe cu efect Cotton negativ - când trec printr-un minim la lungimi de undă mari după care cresc brusc trecând printr-un maxim la lungimi de undă mici (fig. 4 b)).

Curbele „cu efect Cotton" seamănă cu cele ale dispersiei anormale (lucru de aşteptat), respectiv cu cele de variație a indicelui de refracție cu lungimea de undă în domeniul benzii de absorbție al mediului optic respectiv.

Curbele de forma celor prezentate în fig. 4 sunt caracteristice mediilor optic active ce au prima bandă de absorbție (banda de absorbție de la lungimi de undă mari - vezi VIII.2) continuă şi izolată, cazuri ce se întâlnesc mai rar. De obicei peste prima bandă de absorbție se suprapune a doua bandă de absorbție iar în aceste cazuri curbele nu vor mai avea forma simplă din fig. 4 - vezi exemplele prezentate mai jos.

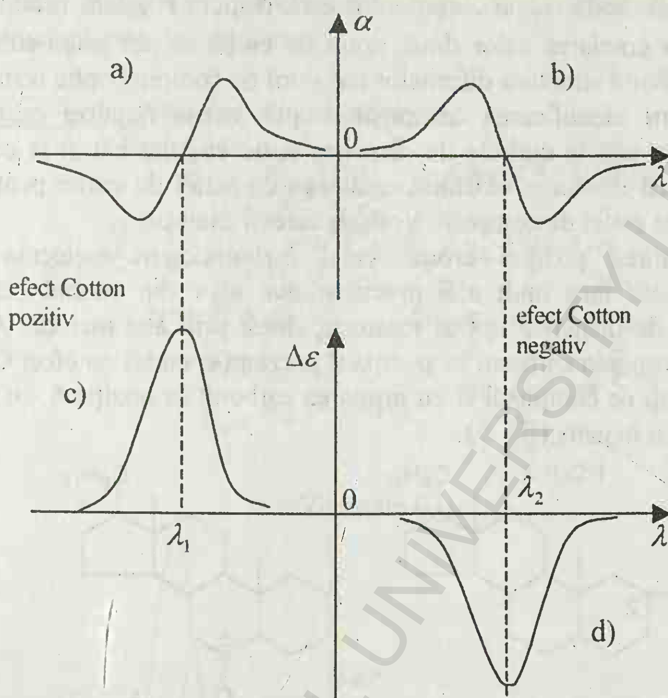


Fig. 4. Curbe schematice de dispersie optică rotatorie (a, b) şi de dicroism optic circular (c, d).

Curbele c) şi d) din fig. 4 reprezintă curbele de dicroism optic circular corespunzătoare aceloraşi medii optic active pentru care s-au trasat curbele de dispersie optică rotatorie.

Curbele de dicroism optic circular se trasează uneori luând în ordonată aşa-numita elipticitate molară, $[\theta]$, definită prin relaţia:

$$[\theta] = 3305(\varepsilon_l - \varepsilon_d),$$

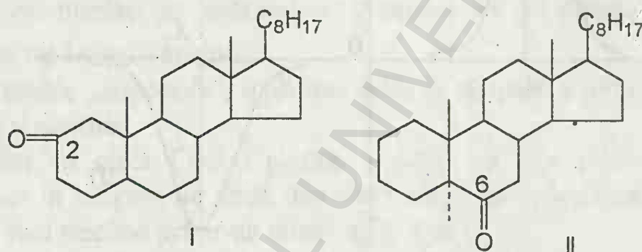
ea măsurându-se în grade·cm^2/decimol.

Se observă că curbele de dicroism optic circular prezintă un maxim, atunci când curbele de dispersie optică rotatorie prezintă efect Cotton pozitiv şi un minim când efectul Cotton este negativ. Se mai observă că maximul curbei c), respectiv minimul curbei d), se realizează

la lungimile de undă λ_1 şi λ_2, pentru care dispersia optică rotatorie se anulează. Din corelarea celor două tipuri de curbe se pot trage concluzii importante privind structura diferitelor categorii de compuşi optic activi.

Pentru identificarea compuşilor optic activi (analize calitative) se poate apela atât la curbele de dicroism optic circular cât şi la cele de dispersie optică rotatorie, existând cataloage cu astfel de curbe pentru un număr mare de astfel de compuşi. Vom da câteva exemple.

Stabilirea poziţiei cromoforului carbonilic în molecula unui steroid se poate face mult mai precis şi mai uşor din studiul curbelor caracteristice de dispersie optică rotatorie, decât prin alte metode. Astfel, cetona I cu gruparea carbonil în poziţia 2 prezintă o curbă cu efect Cotton pozitiv, în timp ce compusul II cu gruparea carbonil în poziţia 6 - o curbă cu efect Cotton negativ (fig. 5).



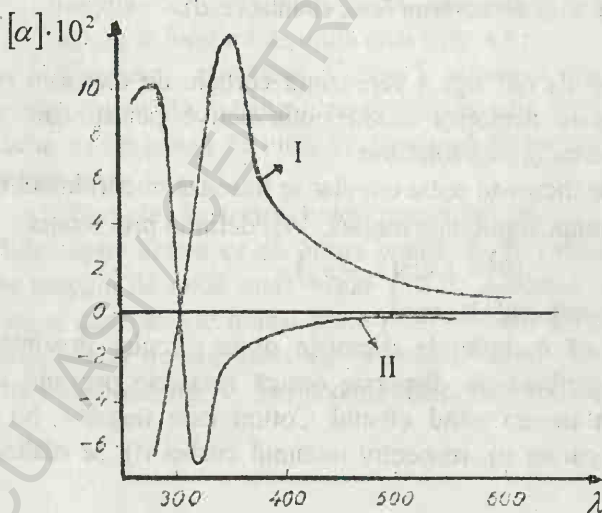
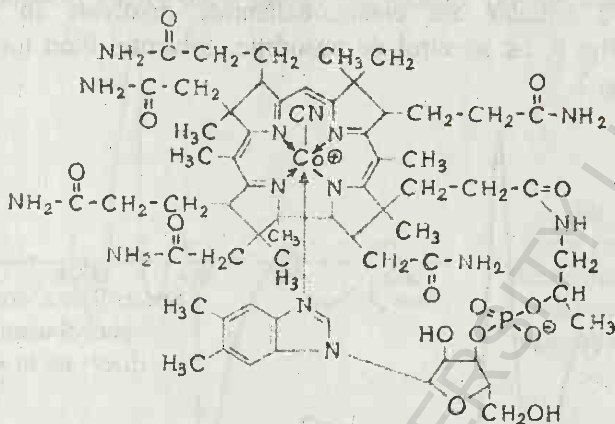


Fig. 5. Curbele de dispersie optică rotatorie ale cetonelor I şi II.

Un alt exemplu îl constituie cianocobalamina (vitamina B_{12}) a cărei structură este dată mai jos:



Vitamina B_{12}

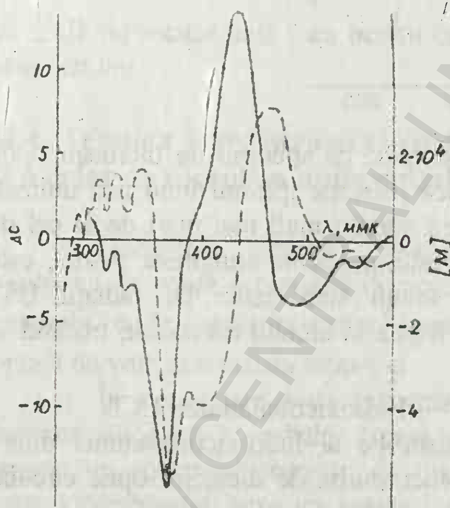


Fig. 6.
Curba (spectrul) de dispersie optică rotatorie (linie întreruptă) şi cea de dicroism optic circular (linie continuă) pentru cianocobalamină dizolvată în apă.

Curbele (spectrele) de dispersie optică rotatorie şi cele de dicroism optic circular ale cianocobalaminei dizolvate în apă sunt prezentate în fig. 6, iar spectrul de absorbţie, solventul fiind tot apa, este prezentat în fig. 7.

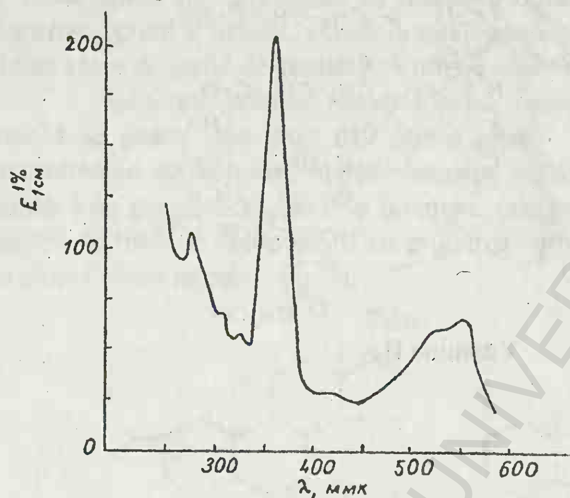
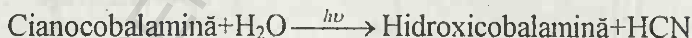


Fig. 7. Spectrul de absorbţie al cianocobalaminei dizolvată în apă.

Se constată, pentru acest compus, că spectrul de dicroism optic circular (cât şi cel de dispersie optică rotatorie ,primul fiind mai utilizat) este mult mai „sensibil", adică suferă variaţii mult mai mari decât cel de absorbţie, la unele modificări ale acestei molecula complexe. Astfel, este cunoscut că prin iradierea unei soluţii slab acide cu radiaţii UV, cianocobalamina pierde grupa cian, legată la atomul de cobalt, trecând în hidroxicobalamină.



Cianocobalamină+H_2O $\xrightarrow{h\nu}$ Hidroxicobalamină+HCN

În timp ce spectrul de absorbţie al hidroxicobalaminei diferă foarte puţin de cel al cianocobalaminei, curba de dicroism optic circular diferă foarte mult (fig. 8)

Analiza cantitativă a unui amestec de compuşi optic activi, utilizând spectrele de dispersie optică rotatorie şi de dicroism optic circular, se face în mod asemănător cu aceea care utilizează spectrele electronice de absorbţie din ultraviolet şi vizibil (vezi IX.4.1),

coeficientul de extincţie molară ε fiind înlocuit fie cu $[\alpha]$ fie cu $\Delta\varepsilon$. Precizia analizei creşte dacă substanţele dozate posedă măcar o lungime

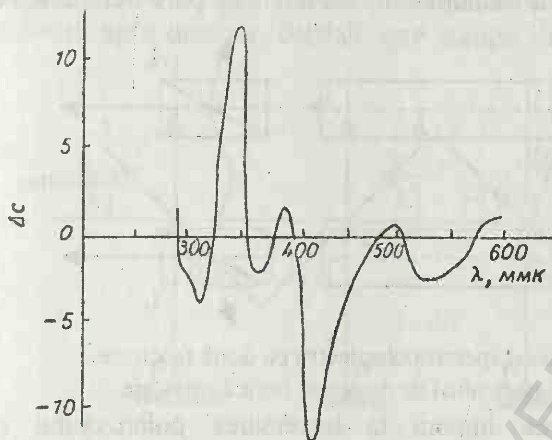


Fig. 8.
Curba (spectrul) dicroismului optic circular a aquacobalaminei.

de undă de rotaţie nulă (sau pentru care $\Delta\varepsilon = 0$) în domeniul de cercetat al spectrului.

II.4. Tehnica înregistrării curbelor de dispersie optică rotatorie şi a celor de dicroism optic circular.

Deoarece tehnica (aparatura) utilizată pentru măsurarea unghiului de rotire a planului de polarizare pentru o anumită radiaţie (de exemplu α_D) - polarimetrul obişnuit, este cunoscută de la cursul de optică nu vom mai insista asupra ei.

În continuare vom prezenta mai întâi tehnica utilizată pentru trasarea automată a curbelor (spectrelor) de dispersie optică rotatorie şi anume un spectropolarimetru de tip „dublu fascicul". Acest dispozitiv este o combinaţie între un spectrofotometru pentru ultraviolet şi vizibil, cu două fascicule (vezi IX.6), şi două polarimetre identice cu optica de cuarţ pentru a permite lucrul în ultraviolet. Polarimetrele se plasează în locul cuvelor pentru solvent, respectiv soluţie. Între nicolii celor două polarimetre se introduc două cuve identice, umplute cu aceeaşi soluţie a substanţei optic active (Fig. 9).

Domeniul spectral de interes pentru dispersia optică rotatorie este în apropierea maximelor de absorbție ale substanței active, pentru care atenuarea fasciculului de radiații este maximă. În plus trebuie luată

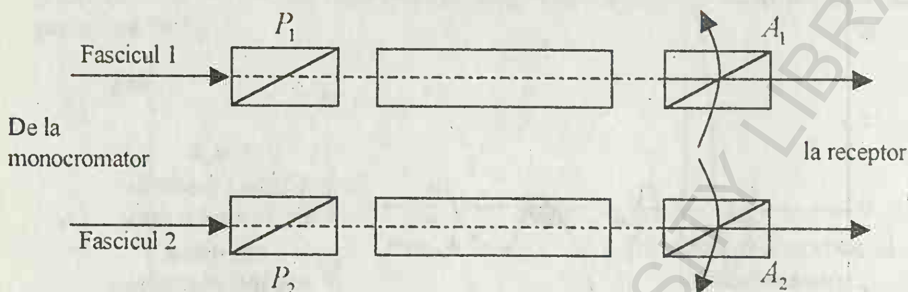


Fig. 9. Schema de principiu a unui spectropolarimetru cu două fascicule pentru înregistrarea curbei (spectrului) de dispersie optică rotatorie.

în considerare și atenuarea luminii la traversarea polarizorului și analizorului. Datorită acestor aspecte, sursa de radiații ce echipează un spectropolarimetru trebuie să fie foarte intensă; se utilizează de obicei lămpi cu xenon de putere.

Polarizoarele se dispun astfel încât direcțiile lor de transmisie, OP, să fie paralele iar analizoarele astfel încât direcțiile lor de transmisie, OA, să formeze unghiuri egale, θ, de circa 60^0 cu cele ale polarizoarelor dar orientate în sensuri diferite - spre dreapta în polarimetrul din dreapta și spre stânga în polarimetrul din stânga: vezi fig. 10; aici $\overrightarrow{E_1}$ și $\overrightarrow{E_2}$ reprezintă vectorii luminii polarizate ce au străbătut cele două cuve, ei fiind egali ca mărime.

În absența unei rotații, componentele $\overline{E_1^1}$ și $\overline{E_2^1}$ ce se obțin în planurile celor doi analizori vor fi egale ca mărime astfel încât cele două polarimetre vor fi străbătute de fluxuri egale ce se compensează.

În cazul apariției unei rotații optice, vectorii $\overrightarrow{E_1}$ și $\overrightarrow{E_2}$ vor fi rotiți sau spre dreapta (fig. 10 (b)) sau spre stânga (fig. 10 (c)) cu același unghi α, astfel că proiecțiile celor doi vectori în planul analizorului nu se vor mai compensa (se știe că măsurătorile la un spectrofotometru se fac prin așa-numita metodă „de zero”, adică se caută să se aducă la egalitate

intensitățile celor două fascicule ce ajung la detector - vezi VIII.4.).

Compensarea celor două fluxuri, astfel ca transmisia să fie de exemplu 50%, se face automat, prin rotirea celor doi analizori cu unghiul α, unul spre dreapta, celălalt spre stânga. În acest mod, la fel cum în

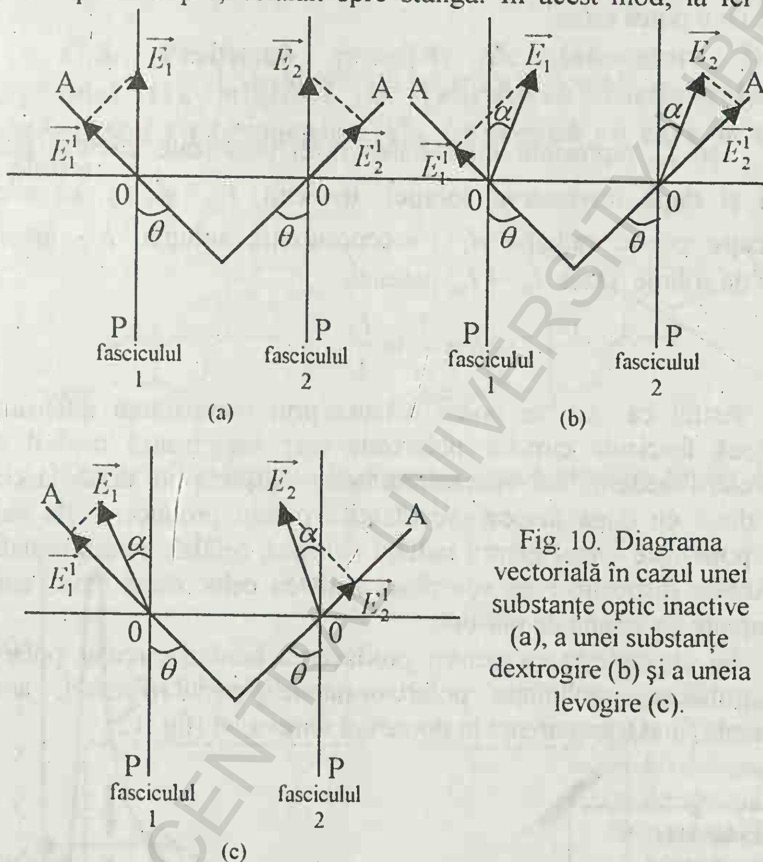


Fig. 10. Diagrama vectorială în cazul unei substanțe optic inactive (a), a unei substanțe dextrogire (b) și a uneia levogire (c).

cazul unui spectrofotometru se trasează curba extincției E în funcție de λ, în acest caz se va trasa curba de variație a lui α tot în funcție de λ.

Curbele (spectrele) de dicroism optic circular se pot trasa și ele cu ajutorul unui spectrofotometru pentru ultraviolet și vizibil adaptat în mod corespunzător.

Din legea lui Lambert-Beer, adaptată măsurătorilor

spectrofotometrice: $I = I_0 10^{-\varepsilon cl}$, se obține:

$$\varepsilon = \frac{1}{cl} \lg \frac{I_0}{I},$$

astfel că vom putea scrie:

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_l - \varepsilon_d = \frac{1}{cl}\left(\lg \frac{I_{0l}}{I_l} - \lg \frac{I_{0d}}{I_d} \right),$$

unde I_{0l} și I_l reprezintă intensitatea razei polarizate circular stânga înaintea și după traversarea soluției; termenii I_{0d} și I_d au aceeași semnificație pentru radiația *d*; c = concentrația soluției, l - grosimea stratului de soluție. Dacă $I_{0l} = I_{0d}$, atunci:

(4) $$\Delta\varepsilon = \frac{1}{cl} \lg \frac{I_d}{I_l}.$$

Astfel că $\Delta\varepsilon$ se poate măsura prin compararea intensităților celor două fascicule circular polarizate care traversează mediul optic activ. Pentru aceasta, un spectrofotometru obișnuit cu două fascicule, trebuie dotat cu două dispozitive identice pentru producerea de radiații circular polarizate - unul pentru radiații de tip *d*, celălalt pentru radiații de tip *l*. Aceste dispozitive se vor plasa înaintea celor două cuve, ambele fiind umplute cu soluția de măsură.

Se obișnuiește ca pentru producerea luminii circular polarizate să se utilizeze combinația polarizor-paralelipipedul Fresnel, ambele componente fiind transparente în domeniul ultraviolet (fig. 12).

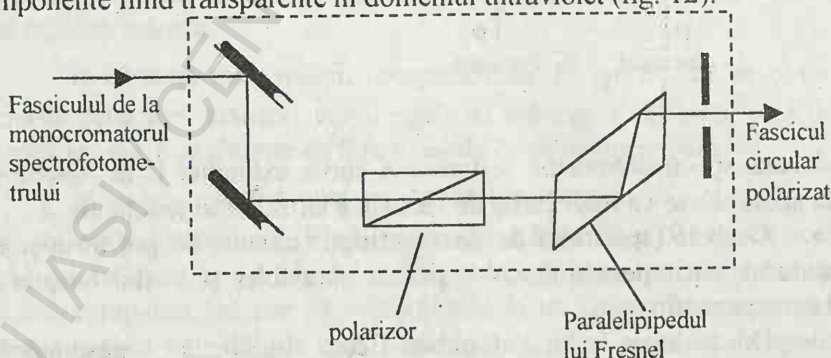
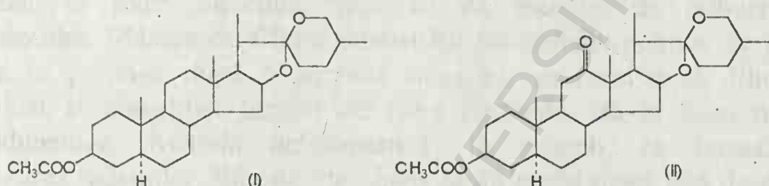


Fig. 12. Dispozitiv pentru producerea luminii circular polarizate.

Dacă se reglează spectrofotometrul astfel că pentru fasciculul d extincţia să fie zero (punând în calea fasciculului l cuva goală), atunci extincţia E dată de aparat, în cazul când şi în cuva din calea fasciculului l se pune soluţie de măsură, va fi: $E = \Delta\varepsilon \cdot cl$.

II.5. Problemă practică de laborator. Dozarea hecogeninei (I), utilizată la fabricarea cortizonului, din amestecul său cu tegogenina (II), împreună cu care se extrage din plante.



Se vor utiliza curbele de dispersie optică rotatorie din fig. 13.

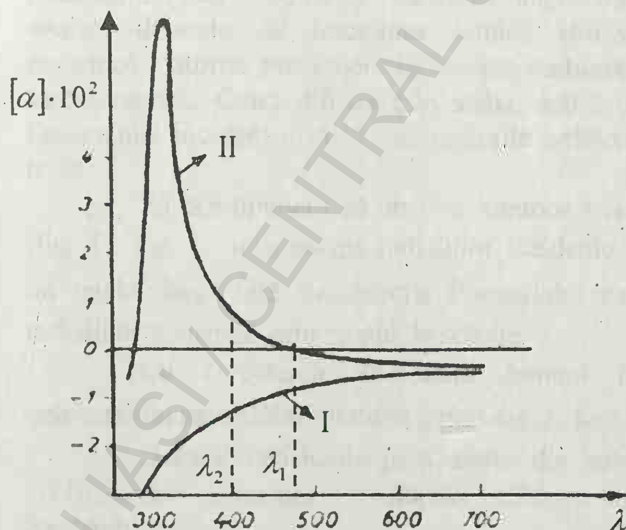


Fig. 13.
Curbele de dispersie optică rotatorie ale acetatului de tigogenină (I) şi ale acetatului de hecogenină (II).

Deoarece „optica” unui polarimetru obişnuit nu este transparentă în ultraviolet, măsurarea unghiurilor α, de rotire a planului de polarizare, se va face la două lungimi de undă λ_1 şi λ_2 situate în domeniul vizibil al spectrului, λ_1 fiind radiaţia pentru care $[\alpha]^{II} = 0$. Deci vom putea scrie:

$$\begin{cases} \alpha_{\lambda_1} = [\alpha]^{I}_{\lambda_1} l c_1, \\ \alpha_{\lambda_2} = \alpha^{I}_{\lambda_2} + \alpha^{II}_{\lambda_2} = [\alpha]^{I}_{\lambda_2} l c_1 + [\alpha]^{II}_{\lambda_2} l c_2. \end{cases}$$

Măsurând α_{λ_1} şi α_{λ_2} se pot calcula concentraţiile c_1 şi c_2, puterile rotatorii specifice fiind scoase din graficele corespunzătoare.

Cap. III . Nefelometria şi turbidimetria.

III.1. Principiile metodelor nefelometrice şi turbidimetrice.

Nefelometria şi turbidimetria sunt metode de analiză înrudite care sunt bazate pe fenomenul de difuzie a radiaţiilor de către soluţiile ce conţin particule materiale dispersate, solide sau coloidale, soluţii numite şi tulburi (suspensii, emulsii). Când lumina traversează un mediu transparent în care se află astfel de particule, o parte a radiaţiilor este difuzată în toate direcţiile, ceea ce dă aspectul de tulbureală al amestecului. Măsurarea slăbirii intensităţii fasciculului colimat de radiaţii (care se propagă după o anumită direcţie), ca rezultat al difuziei şi eventual al absorbţiei luminii de către particule, stă la baza metodei turbidimetrice. Metoda nefelometrică, în schimb, se bazează pe măsurarea radiaţiilor difuzate, de obicei la un unghi drept faţă de direcţia fasciculului incident.

Nefelometria este în general mai sensibilă decât turbidimetria din aceleaşi motive pentru care fluorometria este mai sensibilă decât fotometria (vezi Cap.IX). Alegerea uneia din cele două metode de analiză depinde de fracţiunea luminii difuzate. Când difuzia este puternică, datorită prezenţei mai multor particule, se preferă măsurătorile turbidimetrice. Când difuzia este slabă, astfel că diminuarea intensităţii fasciculului incident e mică, măsurătorile nefelometrice dau rezultate mai bune.

Să presupunem că un flux luminos trece printr-o soluţie tulbure (fig. 1). Fie I_0 intensitatea radiaţiilor incidente, I_r a celor difuzate sub un unghi drept faţă de direcţia fasciculului incident şi I_t intensitatea radiaţiilor transmise prin stratul de soluţie.

Cu cercetarea intensităţii luminii difuzate I_r se ocupă nefelemotria iar a slăbirii luminii transmise I_t faţa de I_o, turbidimetria.

Dacă dimensiunile particulelor din soluţie sunt mai mici decât $\lambda/10$ atunci intensitatea radiaţiilor difuzate este dată de formula lui Rayleigh:

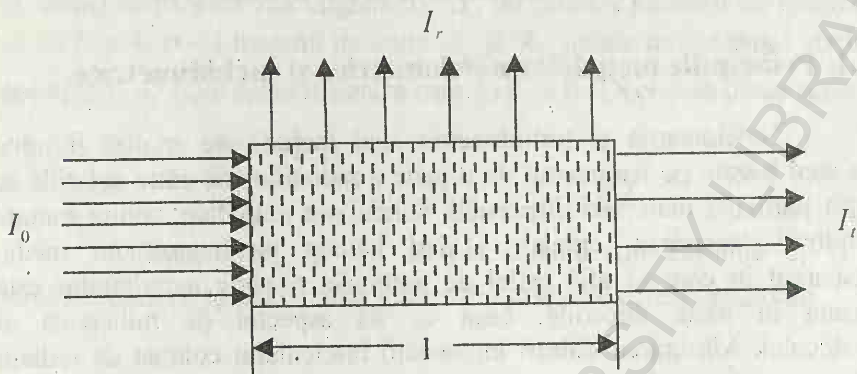


Fig.1. Difuzia luminii de un mediu tulbure.

$$(1) \qquad I_r = I_0\left[\frac{n_e^2 - n^2}{n^2}\frac{Nv^2}{\lambda^4 r^2}\left(1+\cos^2\beta\right)\right],$$

unde n_e şi n sunt indicii de refracţie ai particulelor şi ai mediului, N - numărul total de particule, V - volumul particulei, λ - lungimea de undă a luminii incidente, r - distanţa până la observator, β - unghiul format de lumina incidentă şi cea difuzată.

În cazul analizelor nefelometrice mărimile n, n_e, r şi β rămân constante, de aceea ecuaţia lui Rayleigh poate fi scrisă sub forma simplificată:

$$(2) \qquad I_r = I_0 K\frac{NV^2}{\lambda^4},$$

K fiind un coeficient de proporţionalitate.

Factorul $\frac{1}{\lambda^4}$ ne arată că intensitatea luminii difuzate creşte repede cu micşorarea lungimii de undă. Dacă suspensia de analizat este iluminată cu lumină albă atunci, în urma difuzării mult mai puternice a undelor scurte, lumina difuzată are o nuanţă albăstruie, în timp ce lumina transmisă are o nuanţă roşietică.

Faptul că intensitatea radiațiilor difuzate depinde nu numai de numărul de particule dar și de dimensiunile lor complică destul de mult realizarea practică a analizei nefelometrice.

Dacă dimensiunile particulelor sunt de ordinul lungimii de undă, λ, intensitatea radiațiilor difuzate este proporțională cu $\frac{1}{\lambda^2}$, iar în cazul când aceste dimensiuni sunt mult mai mari decât λ, intensitatea radiațiilor difuzate nu mai depinde de λ, adică toate culorile sunt egal împrăștiate (efect Tyndal). Rezultă deci că în funcție de mărimea particulelor difuzante avem alte dependențe a lui I_r în funcție de I_0.

O variantă a formulei lui Rayleigh pentru soluțiile coloidale pe care le dau proteinele, având aplicații la determinarea masei lor moleculare, este următoarea:

$$I_r = I_0 \frac{2\pi^2 \left(1 + \cos^2 \beta\right) n_0^2 \left(\frac{dn}{dc}\right)^2 Mc}{N_A \lambda^4 r^2},$$

unde: n_0 și n sunt indicii de refracție a soluției și respectiv a solventului, c - concentrația proteinei, λ - lungimea de undă, în nm, a luminii incidente, N_A - numărul lui Avogadro, M - masa moleculară a proteinei.

Intensitatea radiațiilor transmise , I_t, prin stratul tulbure, având grosimea l, în cazul concentrațiilor mici a suspensiilor, este dată de o relație analoagă ecuației lui Lambert-Beer:

$$I_t = I_0 e^{-\tau l},$$

unde τ este coeficientul de turbulență al soluției.

Coeficientul τ este proporțional cu concentrația particulelor în suspensie, de aceea pentru turbidimetrie ecuația fundamentală are forma:

$$I_t = I_0 10^{-Klc} \quad \text{sau:} \quad \lg \frac{I_0}{I_t} = Klc = E \text{ (extincția)},$$

unde $K = 2{,}303 \frac{\tau}{c}$ reprezintă coeficientul molar al turbulenței soluției, iar c concentrația exprimându-se în *moli / litru*.

Experimental s-a stabilit că coeficientul de turbulență variază cu lungimea de undă a radiațiilor după legea: $\tau = s \cdot \lambda^{-t}$, unde s este o constantă pentru sistemul dat. Coeficientul t este dependent de mărimea particulelor şi are valoarea 4 când particulele difuzante au dimensiunea mult mai mică decât lungimea de undă a radiațiilor (difuzia Rayleigh); pentru particule având dimensiuni comparabile cu a lungimii de undă (situația obişnuită în analizele turbidimetrice): $t \approx 2$.

III.2. Modul de efectuare a analizelor. Aplicații.

La analiza nefelometrică şi turbidimetrică trebuie să se respecte o serie de condiții, care determină succesul lucrării:

a) Ca urmare a faptului că la nefelometrare se folosesc de obicei soluții foarte diluate, suspensiile ce se obțin („precipitatele") trebui să aibă o solubilitate foarte mică.

b) Conform ecuației lui Rayleigh, cantitatea de lumină difuzată creşte cu mărirea dimensiunilor particulelor, la o aceeaşi cantitate totală de substanță în suspensie. Deci, obținerea rezultatelor corecte din analiza suspensiilor depinde de metodica de obținere a suspensiilor şi de reproductibilitatea proprietăților lor optice. Asupra dimensiunilor particulelor şi a proprietăților optice ale suspensiilor influențează următorii factori:

- concentrația ionilor care formează precipitatul,
- relația dintre concentrațiile soluțiilor ce se amestecă,
- ordinea amestecării soluțiilor,
- viteza de amestecare,
- timpul necesar pentru obținerea turbulenței maxime,
- stabilitatea dispersiei,
- prezența electroliților străini,
- prezența neelectroliților,
- prezența coloizilor de protecție,
- temperatura şi pH-ul soluției.

Astfel, studierea tuturor acestor factori şi standardizarea condițiilor de preparare a substanței sunt condiții indispensabile pentru o analiză corectă.

c) Suspensiile trebuie să fie stabile în timp şi să nu se depună când stau în repaus. Pentru mărirea stabilității suspensiilor se folosesc uneori coloizi de protecţie cum ar fi gelatina.

Ţinând seama de cele de mai sus rezultă că metodele nefelometrice şi turbidimetrice se utilizează doar pentru efectuarea unor analize cantitative. În acest scop se trasează curbe de etalonare utilizând serii de soluţii etalon cu concentraţii c_i cunoscute ale substanţei ce urmează să fie determinată, respectiv curbele : I_r în funcţie de c_i sau $E = \log\frac{I_0}{I_t}$ în funcţie de c_i.

Aplicarea metodei seriilor de soluţii etalon este destul de limitată deoarece necesită soluţii etalon stabile în timp, adică particulele să rămână de aceeaşi mărime şi să nu formeze un precipitat. Aceasta impune ca, în majoritatea cazurilor, să se folosească soluţii etalon proaspăt preparate, ceea ce îngreunează aplicarea acestei metode. De aceea se utilizează uneori serii de medii imitatoare cum ar fi plăci de sticlă mată cu diferite grade de turbulenţă sau suspensiile stabile în timp ale unor compuşi.

Astfel de suspensii formează, de exemplu, sulfatul de bariu dintr-o soluţie de clorură de bariu în acid sulfuric diluat. Plecând de la această soluţie Mac Lagan a creat o scară de turbiditate ce-i poartă numele, unităţile acestei scări numindu-se unităţi Mac Lagan. Această scară este utilizată pentru a exprima gradul de turbulenţă a unor suspensii întâlnite în laboratoarele medicale (vezi III.3.1).

Metodele turbidimetrice şi nefelometrice sunt pe larg utilizate la analiza apei, pentru determinarea transparenţei şi pentru controlul proceselor de tratare a acesteia. Pe lângă aceasta se mai poate determina concentraţia unei varietăţi de ioni prin utilizarea unor reactivi de precipitare potriviţi.

În tabelul 1 se prezintă câteva specii ce pot fi determinate prin metodele turbidimetrice sau nefelometrice.

Tabel 1. Specii chimice ce pot fi determinate prin metode turbidimetrice şi nefelometrice.

Specii	Metoda	Suspensii	Reactiv	Interferenţe
Ag	T, N	$AgCl$	$NaCl$	-
As	T	As	KH_2PO_2	Se, Te
Au	T	Au	$SnCl_2$	Ag, Hg, Pd, Pt, Ru, Se, Te
Ca	T	CaC_2O_4	$H_2C_2O_4$	Mg, Na, SO_4^{2-} (în concentraţii mari)
Cl^-	T, N	$AgCl$	$AgNO_3$	Br^-, I^-
K	T	$K_2NaCo(NO_2)_6$	$Na_3Co(NO_2)_6$	SO_4^{2-}
Na	T, N	$NaZn(UO_2)_3(OAc)_9$	$Zn(OAc)_2$ şi $UO_2(OAc)_2$	Li
SO_4^{2-}	T, N	$BaSO_4$	$BaCl_2$	Pb
Se	T	Se	$SnCl_2$	Te
Te	T	Te	NaH_2PO_2	Se, As

T= turbidimetrie; N= nefelometrie.

Metodele nefelometrice permit determinări de concentraţii mai mici de câţiva ppm. cu o precizie între 1 şi 5%. Metodele turbidimetrice au aceeaşi precizie doar în cazul soluţiilor mai concentrate.

Aparatura utilizată pentru măsurători nefelometrice este similară cu cea folosită în fluorometrie (vezi IX.5). Măsurătorile de turbiditate se fac de obicei la un spectrofotometru pentru UV-VIS (vezi IX.5) unde se citeşte extincţia E $\left(E = \lg \frac{I_0}{I_t}\right)$ faţă de proba martor, la o lungime de undă unde absorbţia particulelor (dacă ea există) este minimă.

III.3 Probleme practice de laborator.

III.3.1 Efectuarea testului de disproteinemie utilizând metoda turbidimetrică - testul Mac Lagan (cu timol).

Disproteinemie reprezintă termenul prin care se înţelege o modificare calitativă şi cantitativă a proteinelor sanguine, datorită unor anumite afecţiuni.

Prin testele de disproteinemie se înţelege un ansamblu de reacţii care se traduc prin apariţia unei turbidităţi (sau a unei floculări) după adiţia la ser a diferiţilor reactivi, ca urmare a dezechilibrului calitativ şi cantitativ al diferitelor fracţiuni proteice. El poate fi rezultatul diminuării unor factori stabilizanţi (albumine) sau creşterii unor factori precipitanţi (γ-globuline).

Testul Mac Lagan se bazează pe faptul că o soluţie tampon $pH = 7,8$ saturată cu timol floculează globulinele din ser, când acestea sunt crescute peste o anumită concentraţie, formând un complex globulină-timol-colesterol-fosfolipide.

Reactivi necesari (pentru circa 50 analize):

1. Soluţie timol (soluţie stoc):
- timol cristalizat p.a. ....5 g
- alcool etilic 96° ....50 ml
- tampon veronal $pH = 7,8$:
  - acid dietilbarbituric (veronal) ....1,38 g
  - dietilbarbiturat de sodiu ....1,03 g
- apă distilată...500 ml
2. Soluţie de clorură de bariu pentru scara turbidimetrică
- clorură de bariu cristalizată $\cdot 2H_2O$ ....1,15 g
- apă distilată...100 ml
3. Acid sulfuric 0,2 N

Modul de lucru:

Într-un balon cotat de 50 ml se pune 0,5 ml soluţie de timol şi 45 ml tampon veronal $pH = 7,8$. Se încălzeşte pe baia de apă la 70-80 ^{0}C, agitând până la solvirea completă a timolului. După răcire se completează

la semn cu soluție tampon. În felul acesta se obține reactivul timol ce va produce turbiditatea serului.

Pentru a face măsurători la ser se pipetează în două eprubete:

	Probă	Martor
Ser nehemolizat	0,05 ml	-
Reactiv timol	3 ml	3 ml
Apă	-	0,05 ml

Se agită şi se citeşte, după 30 minute, extincția E, de la temperatura laboratorului, pentru $\lambda = 470\, m\mu$, în cuva de 1cm. Această extincție va fi exprimată apoi în unități Mac Lagan, utilizând curba de etalonare trasată cu etaloanele de turbiditate.

Pentru pregătirea etaloanelor de turbiditate se pleacă de la o soluție standard ce conține 3 ml din soluția 2, de clorură de bariu şi 97 ml acid sulfuric 0,2 N. Prin convenție s-a stabilit că soluția respectivă prezintă o turbiditate de 20 unități Mac Lagan (M.L.). Din această soluție se prepară apoi etaloanele de turbiditate prin diluare cu acid sulfuric 0,2N, conform tabelului.

Etalon	ml. soluție standard	ml. acid sulfuric 0,2 N	Unități Mac Lagan (ML)
1	10	-	20
2	9	1	18
3	8	2	16
4	7	3	14
5	6	4	12
6	5	5	10
7	4	6	8
8	3	7	6
9	2	8	4
10	1	9	2

Aceste soluții pot fi utilizate un timp îndelungat dacă eprubetele în care se păstrează sunt închise la flacără sau dacă după astupare se parafinează. Înainte de utilizare se agită bine.

Pentru fiecare soluție etalon se citeşte extincția la lungimea de undă $\lambda = 470\,nm$, în cuva de 1cm, în cuva martor punându-se apă distilată. Cu valorile extincțiilor astfel obținute se trasează curba extincțiilor în funcție de unitățile ML. Această curbă va servi la determinarea numărului de unități ML corespunzătoare probei.

Valorile normale ale turbidității serului sanguin: 0-4 unit. ML.

III.3.2. Determinarea colesterolului total din ser prin metoda turbidimetrică.

Colesterolul total din serul sanguin poate fi determinat prin măsurarea turbidității provocate în urma adiției alcoolatului de sodiu la ser. Reactivi necesari:

1. Soluție alcoolat de sodiu
   - alcool etilic absolut……45 ml
   - NaOH 3%……………..1 ml
   - apă distilată………… 35 ml
2. Soluție NaCl 9 g‰
3. Soluție etalon
   - colesterol………………0,3 g
   - alcool etilic…………….100 ml

Se pipetează în patru eprubete următoarele cantități:

	Probă	Martor probă	Etalon	Martor etalon
Ser fiziologic	1 ml	6 ml	1 ml	6 ml
Ser	0,2 ml	0,2 ml	-	-
Etalon colesterol	-	-	0,2 ml	0,2 ml
Alcoolat de sodiu	5 ml	-	5 ml	-

Se agită şi se lasă în repaus la temperatura laboratorului 10 minute. Se măsoară apoi extincția probei E_p față de martorul-probă şi extincția E_e a etalonului față de martorul-etalon, pentru lungimea de undă $\lambda = 550\,m\mu$. Concentrația colesterolului din ser se va calcula cu relația:

$$C(\text{grame colesterol la 1000ml ser}) = \frac{E_p}{E_e} 0,3 .$$

Valorile normale ale colesterolului total din ser sunt între 220 şi 300 mg/100 ml.

Cap. IV. Microscopul. Observarea prin metoda contrastului de fază.

IV.1. Considerații asupra imaginii unor obiecte de fază.

De multe ori în practica biologică se cere observarea unor microorganisme sau țesuturi care sunt complet sau aproape complet transparente. Cu un microscop obişnuit astfel de observații nu se pot efectua, cu excepția cazului când se utilizează un colorant „de vizualizare". Coloranții, însă, pot produce degradarea sau chiar moartea țesutului sau microorganismelor, astfel că ei trebuie evitați.

Preparatele biologice transparente, ca cele pomenite mai sus, prezintă de fapt neomogenități de drum optic, fie datorită variației Δh a grosimii geometrice, fie variației Δn a indicelui de refracție, fie variației ambelor mărimi n şi h, care determină mărimea drumului optic $\Delta = nh$. Aceste neomogenități de drum optic vor produce modificări de fază ale undelor ce îl traversează, modificări ce nu pot fi puse în evidență în mod obişnuit. Aceasta deoarece ochiul sau alți receptori fizici (fotoelectrici, fotografici etc) pot sesiza doar variațiile de intensitate a undelor luminoase dar nu şi variațiile de fază.

Un obiect transparent care modifică faza undei care trece prin el, dar nu modifică şi amplitudinea undei (de care depinde intensitatea ei) se numeşte obiect de fază.

Pentru punerea în evidență a neomogenităților de drum optic ale obiectelor de fază trebuie să obținem imagini în care diferențele de fază ale undelor care trec prin diferite porțiuni (puncte) ale obiectului să fie transformate în variații de intensitate (iluminare) ale imaginilor aceloraşi porțiuni (puncte) ale obiectului.

Să considerăm drept obiect de fază un strat subțire transparent S, de grosime h şi de indice de refracție n, situat în planul obiect π al obiectivului Ob al unui microscop (fig.1).

Presupunem că obiectul fază S este iluminat, sub incidență normală, cu un fascicul de raze paralele care provin de la o sursă punctiformă I, situată în focarul principal F al lentilei colimator Lc.

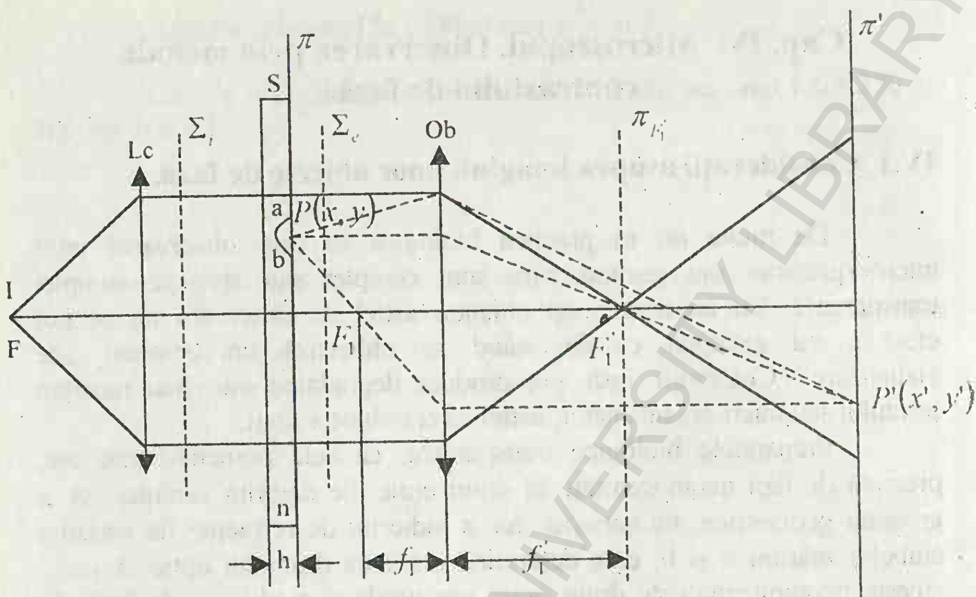


Fig. 1. Imaginea în obiectiv a unui punct obiect P(x,y).

În acest fel radiaţiilor care ajung în orice punct al unei suprafeţe de undă Σ_i a fasciculului incident pe eşantionul S provin din aceleaşi procese de emisie care au loc în sursa punctiformă I. O astfel de iluminare a eşantionului se numeşte iluminare coerentă.

Suprafaţa de undă Σ_i a fasciculului incident este plană şi perpendiculară pe razele fasciculului. Dacă stratul de substanţă S are o grosime optică constantă atunci şi suprafaţa de undă Σ_e a fasciculului emergent va fi de asemenea plană şi perpendiculară pe razele fasciculului. Dacă stratul de substanţă prezintă o neomogenitate de drum optic suprafaţa de undă a fasciculului emergent se deformează în mod corespunzător.

Dacă stratul de substanţă (lama S) este omogen şi transparent putem exprima intensitatea câmpului electric al undei într-un punct oarecare $P(x,y)$ de pe suprafaţa posterioară a lamei (de ieşire din lamă) prin relaţia:

(1) $$E_e(x,y)=E_0 e^{i(\omega t+\Psi_0)},$$

unde E_0 este amplitudinea intensității câmpului electric al undei incidente iar Ψ_0 este faza inițială a undei.

Să considerăm că în vecinătatea punctului $P(x,y)$ lama prezintă o neomogenitate parțial transparentă, caracterizată prin coeficientul de transmisie $\tau(x,y)$ pentru intensitățile de câmp electric și prin variația de fază:

(2) $$\Delta\Psi(x,y)=\frac{2\pi}{\lambda}\Delta(n,h).$$

În aceste condiții intensitatea câmpului electric al undei după trecerea prin zona cu neomogenitate poate fi exprimată prin relația:

(3) $$E_e'(x,y)=\tau(x,y)E_0\cdot e^{i[\omega t+\Psi_0+\Delta\Psi(x,y)]}.$$

Pentru a caracteriza acțiunea neomogenității din lamă asupra fasciculului de lumină transmis vom introduce funcția $F(x,y)$ numită funcție de transfer și care este definită prin relația:

(4) $$F(x,y)=\frac{E_e'(x,y)}{E_e(x,y)}=\tau(x,y)\cdot e^{i\Delta\Psi(x,y)}.$$

În continuare vom neglija pierderile de energie prin reflexie și prin refracție provocate de piesele optice ale obiectivului. Pe de altă parte, se știe că variația fazei între punctele obiect și punctele imagine corespunzătoare obiectivului este aceeași pentru toate punctele conjugate, obiectivul putând fi considerat un sistem aplanatic. Din aceste motive vom putea considera funcția de transfer a obiectivului (ce se poate defini printr-o relație asemănătoare cu (4)) drept o constantă, iar pentru simplificarea calculelor vom lua această constantă egală cu 1.

Distribuția intensității în planul π', în limitele imaginii $P'(x',y')$ a punctului $P(x,y)$, va fi:

(5) $$I(x',y')\cong E_e'E_e'^{*}=\tau^2(x,y)E_0^2.$$

Relația (5) ne arată că distribuția intensității, în limitele imaginii punctului $P(x,y)$, depinde doar de τ și de $\Delta\Psi$. Astfel că, în condițiile obișnuite de observare cu microscopul, variațiile de fază produse de

obiect nu produc şi variaţii de intensitate în planul imagine. Imaginile obiectelor vor putea fi observate doar dacă pentru acestea coeficientul de transmisie $\tau(x, y)$ diferă de cel al domeniilor învecinate.

Să presupunem, în continuare, că neomogenitatea ab, de pe lama S este şi ea un obiect de fază (ca şi lama), adică şi pentru ea $\tau(x, y) = 1$. În aceste condiţii funcţia (3) se poate scrie astfel:

$$E_e'(x, y) = E_0 e^{i[\omega t + \Psi_0 + \Delta\Psi(x,y)]} = E_0 e^{i(\omega t + \Psi_0)} e^{i\Delta\Psi(x,y)},$$

(6)

$$E_e'(x, y) = E_0 e^{i(\omega t + \Psi_0)}[\cos\Delta\Psi(x, y) + i\sin\Delta\Psi(x, y)]$$

Pentru $\Delta\Psi(x, y)$ de valoare mică (cum se întâmplă de obicei) avem: $\cos\Delta\Psi(x, y) \cong 1$ şi: $\sin\Delta\Psi(x, y) \cong \Delta\Psi(x, y)$, astfel că putem scrie relaţia (6) sub forma:

(7) $$E_e'(x, y) = \underbrace{E_0 e^{i(\omega t + \Psi_0)}}_{E_e(x,y)} + \underbrace{E_0 |\Delta\Psi(x, y)| e^{i\left(\omega t + \Psi_0 \pm \frac{\pi}{2}\right)}}_{\Delta E(x,y)},$$

unde $|\Delta\Psi(x, y)|$ este valoarea absolută a diferenţei de fază $\Delta\Psi(x, y)$, care poate fi atât pozitivă cât şi negativă. Luând pentru $\Delta\Psi$ valoarea absolută trebuie să introducem la exponent, în cazul funcţiei $\Delta E(x, y)$, un termen suplimentar $\pm\frac{\pi}{2}$, asta deoarece:

$$e^{i\left(\omega t + \Psi_0 \pm \frac{\pi}{2}\right)} = e^{i(\omega t + \Psi_0)} e^{\pm i\frac{\pi}{2}} = e^{\pm i(\omega t + \Psi_0)}.$$

Relaţia (7) ne arată că la ieşirea din obiectul de fază ab ,unda emergentă poate fi considerată ca rezultanta a două unde şi anume: unda „principală", cu intensitatea de câmp electric $E_e(x, y)$, neafectată de diferenţa de fază $\Delta\Psi$, introdusă de obiect, şi o undă secundară, cu intensitatea de câmp electric:

(8) $$\Delta E = E_0 |\Delta\Psi(x, y)| e^{i\left(\omega t + \Psi_0 \pm \frac{\pi}{2}\right)},$$

a cărei amplitudine e mică şi variază direct proporţional cu valoarea diferenţei de fază $\Delta\Psi(x, y)$. Cele două unde sunt defazate cu $\pm\frac{\pi}{2}$.

Deoarece, aşa cum ne arată relaţia (5), intensitatea în punctul $P'(x', y')$ din planul imagine depinde doar de amplitudinea E_0 a undei principale, pentru a face ca această intensitate să depindă şi de amplitudinea $E_0|\Delta\Psi(x, y)|$ trebuie ca între cele două unde să se introducă o diferenţă de fază suplimentară de $\pm\frac{\pi}{2}$, astfel încât vectorii $\overrightarrow{E_c}(x, y)$ şi $\overrightarrow{\Delta E}(x, y)$ să fie coliniari.

Pentru a ne lămuri cum se poate face aceasta vom analiza o serie de probleme legate de mersul razelor prin obiectiv şi de difracţia acestora.

Se poate, formal, considera că razele undei principale aparţin fasciculului de raze paralele, incidente pe lama S, în timp ce razele undei secundare sunt emise din P sub forma unui fascicul divergent. Fasciculul de raze paralele va fi focalizat în F_1' în timp ce razele fasciculului divergent vor fi focalizate în P' (razele figurate cu linii întrerupte în fig. 1). Se observă că, în timp ce primele raze determină în planul focal al obiectivului, $\pi_{F_1'}$, un punct luminos, celelalte vor determina o zonă luminoasă mai întinsă (ce corespunde intersecţiei acestor raze cu planul $\pi_{F_1'}$).

Să luăm în considerare şi fenomenul de difracţie a luminii şi să analizăm cum influenţează aceasta distribuţia intensităţii luminoase în planul focal $\pi_{F_1'}$ al obiectivului.

În urma difracţiei razelor paralele ce cad pe obiectiv se obţine o figură de difracţie formată din zone circulare (inele) alternativ luminoase şi întunecate, concentrice, cu centrul în F_1'. Maximul principal de difracţie, în care ajunge cea mai mare parte din energia radiantă a fasciculului incident $(\approx 80\%)$, se vede din centrul optic al obiectivului sub unghiul solid:

$$2\theta \cong 2\frac{1,22\lambda}{D},$$

D fiind diametrul obiectivului, mai exact a diafragmei de apertură care

limitează deschiderea activă a obiectivului. Deoarece D este mare unghiul 2θ va fi mic.

Se poate considera că şi neomogenitatea ab se comportă ca un orificiu (sau ca un ecran) care difractă lumina (difracţie Fraunhofer). Diametrul unghiular al maximului central de difracţie din planul focal $\pi_{F_1'}$ va fi:

$$2\theta' \cong 2\frac{1,22\lambda}{ab},$$

adică neomogenitatea formează în planul $\pi_{F_1'}$ o figură de difracţie de dimensiuni mari, ab fiind mic.

Din cele de mai sus rezultă că energia radiantă corespunzătoare undei principale se găseşte distribuită practic pe o arie foarte mică în jurul focarului F_1' (în planul $\pi_{F_1'}$), în timp ce energia radiantă a undei secundare, care provine de la porţiunea neomogenă ab, se distribuie, în acelaşi plan $\pi_{F_1'}$, pe o arie cu atât mai mare cu cât regiunea neomogenă are dimensiunile mai mici.

Această separare spaţială a distribuţiei de energie radiantă permite modificarea intensităţilor de câmp ale undei principale fără să se afecteze sensibil intensităţile de câmp ale undelor secundare produse de neomogenităţile obiectului. Aceste modificări se pot face în două moduri, şi anume prin metoda contrastului de fază şi prin metoda câmpului întunecat (strioscopia).

IV.2. Metoda contrastului de fază.

Această metodă a fost propusă de F. Zernike, pentru care a luat premiul Nobel pentru fizică în anul 1953.

Zernike a avut ideea să acopere partea centrală a figurii de difracţie din planul focal imagine $\pi_{F_1'}$ al obiectivului cu o lamă numită lamă de fază, astfel ca ea să introducă o diferenţă de fază de $\pm\frac{\pi}{2}$

(respectiv de $\frac{\pi}{2}$ sau $\frac{3\pi}{2}$) între cele două unde:

(9) $$\Delta\Psi'_0 = \frac{2\pi}{\lambda}(n_0 - 1)h_0 = \begin{cases}\pi/2 \\ 3\pi/2\end{cases},$$

unde: n_0- indicele de refracție, h_0- grosimea lamei de fază iar $\lambda \cong 550\,nm$ (realizată, de exemplu, cu un filtru galben-verde).

Folosind (8) se poate scrie intensitatea de câmp electric produsă în câmpul imagine de către fasciculul de raze care trec prin vecinătatea focarului F_1' (deci prin lama de fază) sub forma:

(10) $$E_L(x', y') = \tau_0 E_0 e^{i(\omega t + \Psi_0 + \Delta\Psi_0)},$$

la fel cum s-a scris (3).

Majoritatea energiei radiante a fasciculului secundar, cu focarul în punctul $P(x, y)$ și care ajunge în punctul $P'(x', y')$ în condițiile date, trece pe lângă lama de fază astfel că, în primă aproximație, se poate considera că intensitatea de câmp electric $\Delta E(x', y')$ rămâne nemodificată la introducerea lamei de fază. În aceste condiții intensitatea câmpului electric rezultant din punctul $P'(x', y')$ va fi:

(11) $$E_R(x', y') = E_L(x', y') + \Delta E(x', y'),$$

iar intensitatea radiației în același punct va fi:

$$I_R(x', y') \sim E_R(x', y') E_R^*(x', y')$$

După înlocuiri, ținând seama de (8), (9), (10) și (11), se obține:

(12) $$I_R(x', y') \sim E_0^2\left\{\tau_0^2 + 2[\pm\tau_0 \sin\Delta\Psi(x, y) + 1 - \cos\Delta\Psi(x, y)]\right\},$$

în care semnul (+) se ia pentru $\Delta\Psi_0 = \pi/2$, iar semnul (-) pentru $\Delta\Psi_0 = 3\pi/2$.

Intensitatea corespunzătoare fondului (I_F), adică cea din punctele imagine corespunzătoare punctelor obiect situate în afara neomogenității (ab), se va obține din (12) pentru $\Delta\Psi(x, y) = 0$, adică:

(13) $$I_F(x', y') = \tau_0^2(x, y) E_0^2 .$$

Contrastul imaginii obiectului de fază (ab), ce ne arată cum se evidențiază acest obiect față de fond, va fi dat de relația:

(14) $\gamma(x',y') = \frac{I_F(x',y') - I_R(x',y')}{I_F(x',y')} = \frac{2[\pm\tau_0 \sin\Delta\Psi(x,y) - 1 + \cos\Delta\Psi(x,y)]}{\tau_0^2}$

Deoarece γ depinde de coeficientul de transmisie al lamei de fază, alegând potrivit pe τ_0 se poate obține un contrast mare.

Metoda de observare cu contrast de fază este utilizată în special pentru observarea obiectelor de fază în care $\Delta\Psi(x,y)$ are valori mici. În aceste condiții se pot face aproximările:

$$\sin\Delta\Psi(x,y) \cong \Delta\Psi(x,y) \quad , \ \cos\Delta\Psi(x,y) \cong 1,$$

astfel că relațiile (12) și (14) pot fi scrise, în primă aproximație, sub forma:

(15) $$I_R(x',y') \sim E_0^2\left[\tau_0^2 \pm 2\tau_0\Delta\Psi(x,y)\right],$$

(16) $$\gamma(x',y') = \pm\frac{2\Delta\Psi(x,y)}{\tau_0}.$$

Relația (15) ne arată că pentru diferențe de fază mici intensitatea în punctele imagine variază liniar cu diferența de fază $\Delta\Psi(x,y)$. Relația (16) ne arată că și contrastul imaginii este proporțional cu $\Delta\Psi(x,y)$.

Metoda contrastului de fază ne poate da informații și asupra sensului de variație a drumului optic în obiect (relația (15)). Să admitem că folosim o lamă de fază cu $\Delta\Psi_0 = \pi/2$ astfel încât în relația (15) să avem semnul (+). În acest caz, dacă neomogenitatea produce un avans de fază al undei, astfel încât $\Delta\Psi(x,y) > 0$ (ceea ce corespunde la o cavitate în stratul subțire sau un indice de refracție mai mic decât a zonelor învecinate), conform cu (15) iluminarea imaginii neomogenității este mai mare decât a fondului.

În porțiunile din imagine care corespund neomogenităților care produc o întârziere de fază a undei, astfel încât $\Delta\Psi(x,y) < 0$, iluminarea este mai mică decât a fondului.

În cazul unei lame de fază cu $\Delta\Psi_0 = 3\pi/2$ (semnul (-) în (22)), contrastul este inversat față de cazul precedent.

De obicei se utilizează lame de fază cu $\Delta\Psi_0 = \pi/2$.

Contrastul imaginii poate fi mult mărit, în detrimentul

luminozității, folosind o lamă puternic absorbantă. Astfel, dacă lama de fază reduce intensitatea undei directe de N ori, amplitudinea acesteia se va reduce în raportul $\frac{1}{\sqrt{N}}$ (deci $\tau_0 = \frac{1}{\sqrt{N}}$) astfel că relațiile (15) și (16) devin:

$$I_R(x',y') \sim \frac{E_0^2}{N}\left[1 \pm 2\Delta\Psi(x,y)\sqrt{N}\right],$$

$$\gamma(x',y') \cong \pm 2\Delta\Psi(x,y)\sqrt{N}.$$

Pentru a obține imagini mai luminoase în locul unei surse punctiforme de radiații (I, fig. 1) se utilizează o sursă inelară iar lama de fază se realizează de asemenea sub formă inelară. Lățimea lamei de fază are o valoare mică astfel încât lama să acționeze numai asupra undei principale (fasciculul direct) și nu asupra undei secundare, adică asupra razelor difractate la nivelul neomogenităților pe care le prezintă obiectul de cercetat (obiectul de fază).

IV.3. Metoda câmpului întunecat (strioscopia).

Această metodă de observare a obiectelor de fază constă în utilizarea unui mic ecran circular, cu centrul în F_1', de astfel de dimensiuni, încât să acopere maximul central de difracție și primele inele de difracție ale undei principale (considerând sursa I punctiformă).

În condițiile în care $\tau_0 = 0$ (ecran), din (12) se obține:

$$I(x',y') = 2E_0^2\left[1 - \cos\Delta\Psi(x,y)\right].$$

Deoarece funcția $\Delta\Psi(x,y)$ are valori diferite de zero $\left[\cos\Delta\Psi(x,y) \neq 1\right]$ numai în punctele obiect din domeniul neomogenității (ab), intensitatea $I(x',y')$ va fi diferită de zero numai în punctele imagine ale neomogenității. Ca urmare, imaginea obținută apare luminoasă pe un fond întunecat, de aceea se numește metoda de observare în câmp întunecat.

Această metodă indică doar prezența neomogenităților de drum optic, nu și sensul de creștere sau de scădere a drumului optic, deoarece

funcția cosinus este o funcție pară, astfel încât:

$$\cos \Delta\Psi(x,y) = \cos[-\Delta\Psi(x,y)].$$

Riguros vorbind fondul imaginii nu este complet întunecat deoarece ecranul, în funcție de dimensiunile sale, mai lasă să treacă o parte din energia radiantă a undei principale.

PARTEA A DOUA. METODE SPECTRALE DE ANALIZĂ.

Cap. V. Consideraţii generale privind metodele spectrale de analiză.

Analiza spectrală reprezintă o metodă fizică de analiză a compoziţiei unei substanţe (analiză nucleară, atomică şi moleculară) pe baza spectrului său de radiaţii emise sau absorbite.

În fizică (de fapt în spectroscopie) termenul de radiaţie (radiaţii) are un sens mai larg, prin el desemnându-se atât radiaţiile electromagnetice (formate din fotoni, particule fără masă de repaus) cât şi radiaţiile corpusculare – formate din particule materiale: electroni, neutroni, protoni, particule α, ioni etc.

Ţinând seama de acest înţeles al termenului de radiaţii putem defini spectrul radiaţiilor emise de o substanţă, de exemplu, ca dependenta (graficul) numărului de particule emise în unitatea de timp, de către unitatea de suprafaţă a "sursei" de radiaţii (număr de care depinde intensitatea radiaţiilor emise de sursă) de energia E a particulelor individuale. În cazul radiaţiilor electromagnetice din domeniul optic (radiaţii infraroşii, vizibile şi ultraviolete) spectrul se reprezintă de obicei în coordonatele I, ν (uneori în coordonatele I, λ), ν fiind frecvenţa fotonilor (energia lor fiind $E = h\upsilon$). Intensitatea I se defineşte prin energia radiaţiilor ce cad în unitatea de timp pe unitatea de suprafaţă a unui receptor, sau a unui mediu absorbant, perpendiculară pe direcţia lor de propagare.

Vom prezenta în continuare două tipuri de spectre de emisie şi anume un spectru de linii şi un spectru continuu: fig. 1 şi fig. 2.

Pentru a se înregistra spectrul radiaţiilor absorbite de substanţă pe aceasta se trimit, de obicei, nişte radiaţii cu spectru continuu. Dacă se fac măsurători similare cu cele efectuate pentru înregistrarea spectrelor de emisie vom obţine nişte imagini ca în fig. 3 şi 4.

Reprezentările spectrelor de absorbţie, făcute mai sus, nu sunt avantajoase, preferându-se alte reprezentări, cum vom vedea mai târziu.

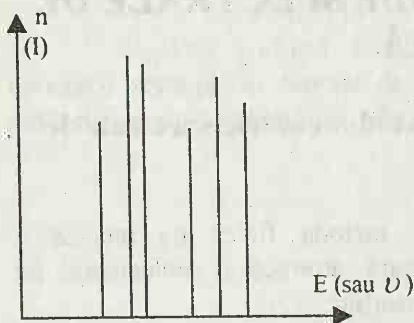


Fig. 1. Spectru de emisie de linii (spectru α, neutronic, de masă, de radiatii γ, x, radiatii optice etc.).

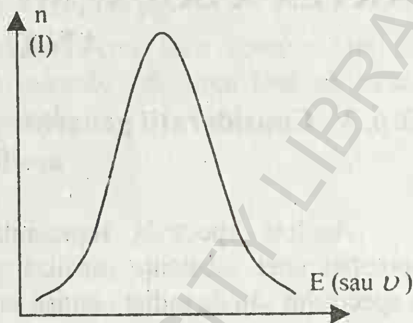


Fig. 2. Spectru de emisie continuu (radiații β, spectrul corpului negru, spectrul unei lămpi spectrale de Xe).

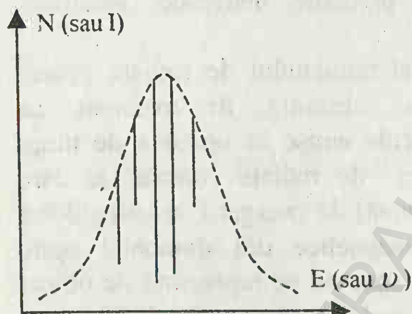


Fig. 3. Spectru de absorbție de linii,

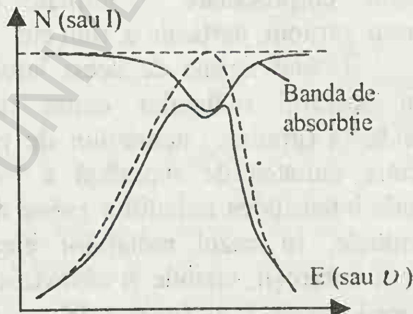


Fig. 4. Spectru de absorbție continuu (de bandă).

Fiindcă spectroscopia optică lucrează doar cu radiațiile electromagnetice din domeniul optic, în această ramură a spectroscopiei spectrul unei radiații (a unei surse de radiații) se definește ca un ansamblu de imagini ale fantei de intrare a unui aparat spectral cu prismă sau cu rețea de difracție (imagini numite linii spectrale), fiecare linie obținându-se cu radiații de o anumită frecvență (monocromatice). Numărul de linii spectrale ale unei radiații va fi deci egal cu numărul de componente monocromatice ale acelei radiații. Putem vorbi atât de linii de emisie, radiații prezente în sursă, cât și de linii de absorbție, radiații

lipsă.

Noțiunea de linie spectrală a căpătat un înțeles mai larg, ea desemnând fie o radiație monocromatică emisă sau absorbită (se vorbeşte, de exemplu, de linia galbenă a sodiului etc), adică un grup de fotoni de aceeaşi energie $h\upsilon$, fie un grup de particule având aceeaşi energie, de exemplu linie α, linie β, linie de masă (în cazul spectrometrelor de masă) etc.

Trebuie de precizat că analiza spectrală modernă nu se bazează doar pe înregistrarea spectrului radiațiilor emise sau absorbite de o substanță. În cazul radiațiilor optice, de exemplu, pe lângă intensitatea I se mai măsoară faza oscilațiilor, polarizarea, timpul de viață al stărilor excitate, studiindu-se de asemenea şi modificările spectrului după diverşi timpi scurşi din momentul excitării substanței (timpi de ordinul nano sau femto secundelor) – obținându-se aşa numitele spectre rezolvate în timp. Acestea sunt doar o parte din metodele de studiu care necesită aparatură specială foarte costisitoare.

Avantajele analizei spectrale sunt următoarele:

a) Are o mare sensibilitate permițând determinarea (identificarea şi dozarea) unor compuşi (atomici sau moleculari) prezenți într-o probă în cantități foarte mici – mergând până la concentrații de cca. 10^{-10} M/l şi chiar mai mici. S-a ajuns până acolo încât o şedere, de o anumită durată de timp, a unei persoane într-o încăpere să poată fi pusă în evidență prin analiza spectrală a aerului din acea încăpere, în care au rămas urme ale mirosului specific, de fapt a unor compuşi chimici volatili specifici fiecărei persoane ("amprenta de miros" sau "amprenta chimică"). Pe baza acestei amprente acționează de fapt şi câinii polițişti, nişte adevărați detectori naturali.

Această mare sensibilitate este necesară şi pentru controlul poluării mediului cu diverse substanțe nocive. S-ar părea la prima vedere, că prezența unor cantități extrem de mici de astfel de substanțe în aer, apă, alimente etc nu ar putea avea efecte nocive asupra organismului. Aşa este dacă ele acționează un timp relativ scurt (zile, luni). Dacă acțiunea este de lungă durată (şi continuă) – de ordinul anilor, pot apărea boli foarte grave.

b) Necesită cantități mici din substanța cercetată, analiza putându-se

efectua chiar fără prelevări de mostre, de exemplu controlul topiturilor de oţel pentru controlul concentraţiei unor elemente, ca să se poată interveni imediat, localizarea unei tumori la creier etc.

c) Permite determinarea simultană aproape a tuturor elementelor chimice sau tipurilor de molecule prezente într-o probă dată.

d) Durata unei analize spectrale este foarte scurtă – de ordinul minutelor, secundelor şi chiar mai mică, în funcţie de aparatul spectral utilizat. S-a ajuns până acolo încât aparatele spectrale sunt plasate în avioane iar analizele (la plante, sol şi apă) se fac în timp ce avionul zboară deasupra.

Mai nou, unele tipuri de spectrometre sunt utilizate pe post de radar în vederea detectării avioanelor "invizibile" pentru radarele obişnuite. Detecţia se face pe baza spectrelor moleculare şi atomice ale gazelor de ardere (CO, CO_2, NO), spectre emise la temperatura acelor gaze (1500-2000 ^{0}C).

Ţinând seama de marile ei avantaje, analiza spectrală a devenit o metodă indispensabilă de analiză şi control în aproape toate activităţile umane (deocamdată în ţările avansate): în medicină, biologie, agronomie, industria alimentară, industria chimică şi de medicamente, industria grea, industria uşoară, geologie, artă, muzee, industria militară etc.

Clasificarea metodelor de analiză spectrală.

S-au elaborat un număr mare de metode spectrale de analiză (de ordinul zecilor) ce aparţin diverselor tipuri de spectroscopii (spectrometrii) şi care sunt de fapt nişte discipline de sine stătătoare ce s-au desprins din următoarele discipline mari: Fizica atomului, Fizica moleculei, Fizica nucleară, Fizica corpului solid. Toate acestea utilizează pe larg metodele Mecanicii (fizicii) cuantice. Desigur că în aceste spectroscopii se pun doar bazele teoretice şi experimentale ale diverselor metode de analiză spectrală. Pentru a se efectua practic diverse analize trebuie să se apeleze la cărţi suplimentare, ghiduri practice.

Clasificarea metodelor de analiză spectrală este mai greu de făcut deoarece există mai multe criterii cum ar fi: modul de obţinere a spectrelor, modul de înregistrare a lor, domeniul frecvenţelor (sau energiilor particulelor) în care apar spectrele, natura centrilor care emit

sau absorb (nucleele atomilor, atomii, ionii atomici, moleculele sau ionii moleculari etc).

În cazul spectroscopiilor clasificarea lor se face de obicei după natura radiaţiilor utilizate (studiate) şi după natura centrilor de emisie şi absorbţie.

După natura radiaţiilor utilizate cele două clase mari ar corespunde prima, radiaţiilor corpusculare şi a doua, radiaţiilor electromagnetice.

A) Spectrometria (spectroscopia) radiaţiilor corpusculare.

1) Spectrometria radiaţiilor emise de nucleele radioactive:
   a) spectrometria α,
   b) spectrometria β,
   c) spectrometria neutronică etc.
- aplicaţii: punerea în evidenţă şi dozarea diferitelor tipuri de elemente radioactive pe baza spectrelor respective. Această radioactivitate poate fi sau naturală sau indusă (artificială), o metodă des folosită în acest scop este "activarea" cu neutroni (reacţii nucleare provocate de neutroni).

2) Spectroscopia fotoelectronică :
- utilizează electronii emişi de substanţă prin iradierea ei cu radiaţii ultraviolete şi X (efect fotoelectric extern),
- aplicaţii: punerea în evidenţă a diferitelor specii de atomi sau molecule într-o probă cunoscând energia fotonilor incidenţi şi măsurând energia fotoelectronilor emişi.

3) Spectrometria de masă :
- utilizează ioni atomici şi moleculari a căror masă este măsurată cu o precizie mare.
- se foloseşte la analiza atomică şi moleculară a probelor aduse în stare de vapori pentru a se putea realiza fascicule atomice sau moleculare.

B) Spectroscopia (spectrometria) radiaţiilor electromagnetice.

În funcţie da natura centrilor de emisie şi absorbţie întâlnim următoarele clase:

1) Spectrometria nucleară :
   a) Spectrometria γ de emisie şi absorbţie a nucleelor "libere" (situaţia obişnuită a nucleelor),

b) Spectrometria γ de emisie şi absorbţie a nucleelor “legate rigid” în reţeaua cristalină (situaţie întâlnită la răcirea cristalului la câţiva K) = spectrometria Mössbauer.

c) Spectrometria de rezonanţă magnetică nucleară (RMN) ce utilizează tranziţiile de absorbţie între nivelele Zeeman ale nucleelor impare (având un număr impar de protoni sau neutroni). Aceste tranziţii sunt induse (produse) de radiaţii electromagnetice de radiofrecvenţă (de circa 10^6 Hz).

-spectrometriile a) şi b) au cam aceleaşi aplicaţii ca cele amintite la A.1. În ce priveşte spectrometria de tip c) ea se aplică de obicei substanţelor ne radioactive, ea având numeroase aplicaţii pentru determinarea compuşilor ce conţin ^{1}H, ^{2}H şi alte câteva nuclee (^{19}F, ^{13}C, ^{31}P).

2) Spectroscopia atomică :

a)Spectroscopia atomică de emisie şi absorbţie din vizibil şi ultraviolet:

- utilizează liniile emise sau absorbite de atomii sau ionii atomici cu ocazia tranziţiilor dintre nivelele electronice ale acestora.
- aplicaţii: determinarea elementelor componente (atomii) ale probelor solide, lichide şi gazoase.

a) Spectrometria de emisie din domeniul X :

- utilizează spectrele X de linii ale atomilor, excitarea atomilor făcându-se sau cu electroni (în tuburile de raze X) sau cu fotoni X sau γ în care caz se vorbeşte de fluorescenţa de raze X. Fluorescenţa de raze X este metoda cea mai utilizată la analizele spectrale.
- aplicaţii: analize foarte precise de elemente chimice (atomi) prezente într-o probă, indiferent de starea de agregare a substanţei.

b) Spectroscopia de rezonanţă electronică de spin (RES) :

- studiază tranziţiile de absorbţie între nivelele Zeeman ale atomilor sau ionilor monoatomici la care momentul cinetic orbital este nul, dar care posedă un singur electron pe pătura exterioară s. RES se aplică şi în cazul ionilor elementelor tranziţionale cât şi la electronii

cu spin necompensat ai defectelor de structură (exemple: atomii de dopare a semiconductorilor)

3) Spectroscopia moleculară:

a) Spectroscopia moleculară de absorbţie şi emisie din domeniul microundelor şi IR îndepărtat.

- studiază tranziţiile dintre nivelele de rotaţie ale moleculelor aflate în starea electronică fundamentală şi pe nivelul de vibraţie cel mai coborât (tranziţii de rotaţie).
- necesită tehnici speciale şi e mai dificil de utilizat.

b) Spectroscopia moleculară de absorbţie din infraroşu (IR):

- studiază tranziţiile dintre nivelele de vibraţie ale moleculelor aflate în starea electronică fundamentală (tranziţii de vibraţie-rotaţie)
- este folosită la analiza moleculară a substanţelor gazoase, lichide, solide (sub formă de pulberi sau filme subţiri) cât şi a acelora aflate în faza condensată (soluţii).

Metoda de analiză utilizând spectroscopia moleculară de absorbţie din IR este una din cele mai utilizate metode la efectuarea de analize moleculare. În chimie, de exemplu, analiza unui nou compus nu se poate concepe fără înregistrarea spectrului IR de absorbţie şi a celui RMN. În ultimul timp, odată cu perfecţionarea receptorilor de radiaţii din IR cât şi a surselor de excitare (laserii), a început să se dezvolte şi spectroscopia moleculară de emisie din IR.

c) Spectroscopia Raman:

- este o metodă de studiu a tranziţiilor de vibraţie-rotaţie ale moleculelor utilizând în loc de radiaţii din IR, radiaţii din domeniul vizibil sau UV , ea bazându-se pe efectul Raman (difuzia combinată a luminii)
- este folosită la fel ca şi spectroscopia de la punctul b) la diverse analize, ea pretându-se în special la substanţe în stare lichidă (sau soluţii) cât şi în stare gazoasă sau solidă.

d) Spectroscopia moleculară de absorbţie din UV şi VIS :

- studiază tranziţiile dintre nivelele electronice ale moleculelor – tranziţii electronice de vibraţie-rotaţie.

- este foarte mult utilizată în cele mai diverse domenii pentru analize moleculare ale substanțelor aflate în toate stările de agregare în special în soluții (faza condensată). Este o metodă relativ simplă necesitând aparatură nu prea costisitoare.

a) Spectroscopia moleculară de emisie din UV şi VIS (de luminescență):
   - studiază spectrele de emisie ale moleculelor excitate pe nivelele electronice superioare (tranzițiile electronice de vibrație-rotație).

În funcție de modul de excitare a uminescenței s-au creat următoarele subramuri:

- Fotoluminescența (spectroscopia de fotoluminescență) – excitarea se face sub acțiunea radiațiilor electromagnetice
- Electroluminescența – excitarea se face cu câmpuri electrice,
- Catodoluminescența – excitare cu electroni,
- Radioluminescența – excitare cu radiații nucleare,
- Sonoluminescența – apare de obicei în lichide supuse influenței unor unde sonore intense
- Chemiluminescența – energia de excitare apare în urma unor reacții chimice cum ar fi oxidarea lentă a unor substanțe organice. O manifestare deosebită (specială) a chemiluminescenței o reprezintă termoluminescența care apare în cazul când reacția chimică, necesară "activării" luminescenței, are los în urma încălzirii aparatului. Fenomenul de chemiluminescență ce apare în substanțe biologice (organisme vii) a primit denumirea de bioluminescență – ex: licurici, viermi, moluşte, etc.

b) Spectroscopia de rezonanță electronică de spin (RES):
   -studiază tranzițiile dintre nivelele Zeeman corespunzătoare radicalilor moleculari având un electron cu spinul necompensat (substanțe paramagnetice).

Din marea varietate a metodelor de analiză spectrală, aplicații directe ale diverselor tipuri de spectroscopii, vom studia doar câteva, mai accesibile laboratoarelor obişnuite, având o dotare medie.

Cap. VI. Analiza spectrală utilizând spectrele atomice de emisie din domeniul vizibil şi ultraviolet.

VI.1 Moduri de excitare a atomilor. Surse spectrale.

Principalele moduri de excitare a atomilor sunt ciocnirile lor cu electroni, ioni, atomi şi fotoni. Excitarea cu primele trei tipuri de particule se face în aşa-numitele surse spectrale (un fel de "cuve" cu atomi, în care sunt prezente şi particulele excitatoare, de aceea le putem numi şi "cuve cu plasmă") cum ar fi: flacăra, arcul electric, scânteia electrică etc. Se consideră că în astfel de surse se realizează echilibrul termodinamic, adică temperatura se stabileşte la o anumită valoare constantă, T.

Atomii prezenţi în cuva cu plasmă se excită pe cale termică, preluând energia termică a particulelor cu care se ciocnesc (cele mai eficiente fiind electronii) iar distribuţia lor (a atomilor) după nivelele de energie se face conform legii de distribuţie a lui Boltzmann:

$$N_i = N_0 \frac{g_i}{g_0} \cdot e^{-\frac{E_i}{kT}},$$

unde: N_0 – numărul total de atomi prezenţi, g_i, g_0 – ponderile statistice ale stării excitate, respectiv a celei fundamentale, N_i – numărul de atomi aflaţi în starea de energie E_i. (E_i reprezintă energia de excitare a nivelului i; pentru starea fundamentală se ia $i = 0$, deoarece pentru această stare energia de excitare este nulă, adică $E_0 = 0$). În aceste condiţii intensitatea spectrului emis va fi determinată în principal de temperatură. În cazul plasmei unei descărcări electrice şi când se consideră că excitarea se face cu electroni, T reprezintă temperatura electronică, adică aceea ce rezultă din relaţia: $eU = \frac{3}{2} kT$, e fiind sarcina electronului iar U tensiunea de accelerare a acestuia.

Cu totul altă situaţie avem în cazul excitării cu fotoni. Cuva cu atomi aflaţi la o anumită temperatură T, mult mai mică decât cea

necesară excitării lor termice, este iradiată cu fotoni (cu radiații electromagnetice). Fotonii ce intră în cuvă, şi care în parte sunt absorbiți de atomi excitându-i, practic nu modifică temperatura T, astfel că nu mai putem vorbi de o distribuție Boltzmann. Se spune că avem o distribuție de neechilibru a atomilor excitați după nivelele de energie, în care caz intensitatea spectrului emis nu mai este determinată de temperatură. Emisia atomică în cazul excitării cu fotoni a primit denumirea de fluorescență atomică, ea constituind obiectul unei sub-discipline de sine stătătoare şi anume "spectroscopia de fluorescență atomică". Această disciplină s-a dezvoltat în ultimii 30-35 de ani.

Din considerente istorice, când se vorbeşte de emisia atomică (sau de spectroscopia de emisie atomică) se înțelege doar emisia din sursele spectrale citate (excluzându-se excitarea cu fotoni), acest procedeu de excitare folosindu-se de mai bine de 100 de ani. În continuare vom prezenta, pe scurt, principalele surse spectrale utilizate în spectroscopia de emisia atomică.

VI.1.1. Flacăra.

Se utilizează flăcările rezultate din următoarele amestecuri de gaze (primul – combustibilul sau carburantul, iar al doilea – comburantul):

Acetilenă – aer	T = 2500 K
Acetilenă – oxigen	T = 3400 K
Hidrogen – aer	T = 2300 K
Metan – aer	T ≈ 2200 K
Propan – aer	T ≈ 2200 K
Butan – aer	T ≈ 2200 K
Cianogen – aer	T = 2600 K
Cianogen – oxigen	T = 4600 K

Datorită temperaturii nu prea ridicate ce se obține într-o flacără, excitarea în flacără își găseşte, în analiza spectrală de emisie, un câmp de aplicație strict delimitat şi anume la analiza calitativă şi cantitativă a metalelor uşor excitabile, în special a celor din primele trei coloane ale

tabloului periodic al elementelor, a metalelor din jurul Fe şi a câtorva pământuri rare. Există totuşi o serie de elemente a căror spectre nu apar în flacără deşi potenţialele lor de excitare sunt mici: Al, Ti, V, Zn, Mo, Ta, W, Re, Os, Bi, U, potenţialul de excitare fiind sub 3,5 V. Cauza este că aceste elemente dau, sau oxizi greu disociabili, sau greu volatili.

Deoarece în flacără predomină doar liniile de rezonanţă înseamnă că spectrele de flacără sunt sărace în linii, ceea ce constituie un avantaj în ceea ce priveşte separarea liniilor de emisie a diferitelor elemente. Condiţiile de excitare şi de introducere a substanţei în flacără pot fi făcute atât de stabile încât să permită o analiză cantitativă cu o precizie mergând până la 1%.

Sensibilitatea mare a analizei se datorează şi faptului că fotoreceptorii (de obicei fotomultiplicatori) nu sunt perturbaţi de câmpurile electrice exterioare (nu se formează perturbaţii în schemele de amplificare), cum se întâmplă în cazul arcului electric sau a scânteii electrice. Analizele ce utilizează flacăra ca mijloc de excitare se fac de obicei pentru soluţiile în apă distilată ale probelor de cercetat, apa ne-fiind nici toxică nici inflamabilă (probele insolubile în apă se atacă cu acizi potriviţi pentru a obţine săruri solubile). Aceste soluţii sunt pulverizate apoi în flacără. În acest caz flacăra are şi rolul de-a atomiza proba, adică de a crea atomi liberi.

Procesele care preced atomizarea într-o flacără sunt următoarele: uscarea (evaporarea solventului), calcinarea, topirea şi evaporarea compuşilor moleculari prezenţi. Atomizarea are loc ca urmare a disocierii acestor compuşi. La alegerea unui anumit tip de flacără (a unei anumite perechi carburant-comburant) trebuie de avut în vedere ca procesele pomenite mai sus să se realizeze în condiţii optime.

Montajul obişnuit al unei instalaţii de analiză utilizând flacăra (fotometru cu flacără) este prezentat în fig. 1. Tot aici se prezintă şi structura unei flăcări (regiunile ei).

Radiaţiile proprii ale flăcării (în cazul când gazele utilizate sunt pure) depind de regiunile ei. În conul de reacţie (zona în care are loc combustia) întâlnim benzi intense ale C_2 şi CN situate în vizibil şi ultra-violet, ceea ce împiedică folosirea acestei regiuni în analiza spectrală. În

faclă întâlnim radiații slabe ale radicalului OH, ușor excitabil. Excitarea atomilor probei supuse analizei are loc practic în faclă, unde se stabilește și echilibrul termodinamic, adică se realizează o anumită temperatură T, constantă, caracteristică tipului de flacără.

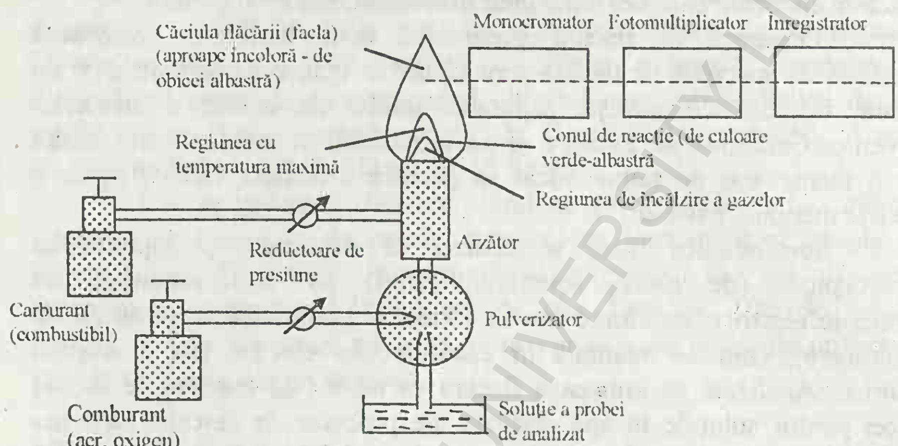


Fig. 1. Schema de principiu a unui fotometru cu flacără.

O serie de dezavantaje ale flăcării obișnuite sunt înlăturate de așa- numita flacără cu plasmă numită și plasmatron. Ea se poate obține la capătul unui tub de cuarț de 15-30 mm în diametru. Acest tub este înfășurat cu o bobină (spiră) legată la un generator de înaltă frecvență, între 4 și 50 MHz, și puteri de la 1 la 5 kW (Fig. 2).

Prin tubul de cuarț "curge" un gaz inert (de obicei argon) care este suportul plasmei și răcitor al tubului. Pentru a se forma plasma este utilizată scânteia de la o bobină Tesla, în vederea realizării "germenilor" de electroni sau ioni în regiunea bobinei. De îndată ce argonul devine conductor plasma se formează în mod spontan, dacă curgerea prin tub este uniformă.

Curentul indus, format din ioni și electroni (care se mișcă pe direcții circulare), încălzește gazul de suport până la temperaturi de ordinul a 9000-10000 K și susține ionizarea necesară pentru a se realiza o

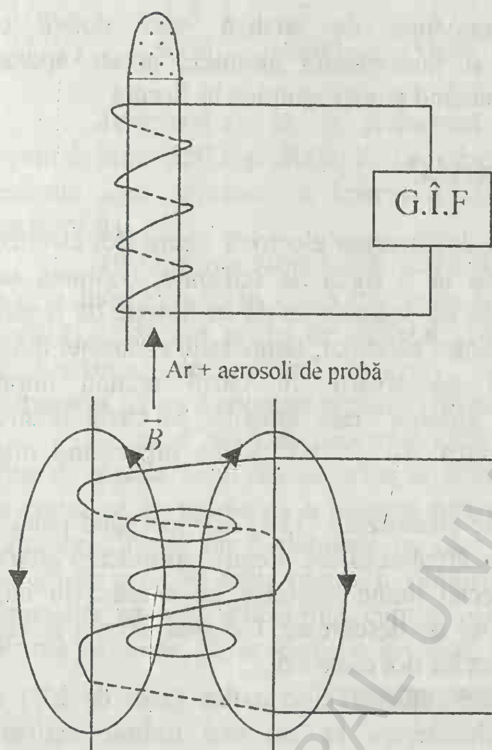


Fig. 2. Flacăra cu plasmă (plasmatronul).

plasmă stabilă. Proba sub formă de aerosoli este introdusă împreună cu argonul, jetul de gaz având şi rolul de a împinge plasma spre capătul tubului, plasmă ce iese din acesta sub forma unui jet stabil, lung de 10-15 mm: flacăra cu plasmă.

Avantajele acestei flăcări sunt numeroase – temperatură mare, timp lung de existenţă, densitate mare de electroni, atomii liberi se formează într-un mediu aproape inert, speciile moleculare sunt absente sau prezente într-un număr foarte mic, nu foloseşte gaze explozive.

Pentru analizele curente din laboratoarele obişnuite (medicale, alimentare, farmaceutice etc) fotometrul cu flacără este prevăzut, în locul monocromatorului, cu o serie de filtre pentru liniile de rezonanţă ale elementelor ce urmează a fi determinate, iar în loc de fotomultiplicator şi înregistrator, cu o celulă fotoelectrică cuplată cu un galvanometru.

În cazul când laboratoarele de analiză sunt dotate cu spectrofotometre de absorbție și fluorescență atomică, aceste aparate permit și efectuarea de analize utilizând emisia atomică în flacără..

VI.1.2. Arcul şi scânteia electrică.

Aceste surse utilizează descărcarea electrică dintre doi electrozi situați de obicei în aer și legați la o sursă de tensiune, continuă sau alternativă. Denumirea de arc sau de scânteie se dă în funcție de o serie de factori cum ar fi: tensiunea dintre electrozi, temperatura plasmei dintre electrozi, durata și caracterul descărcării. În cazul arcului durata descărcării este mai mare iar "arderea" este liniștită; în cazul scânteii durata descărcării este foarte mică :$10^{-7} - 10^{-8}$ s, ea provocând niște "pocnituri" caracteristice.

La tensiuni mici aplicate electrozilor (110, 220 mergând până la câteva mii de volți) întâlnim descărcarea în arc. Pentru aprinderea arcului se recurge la un generator special numit activator ce creează în mod artificial sarcini electrice în spațiul de descărcare. Cel mai simplu se face aprinderea arcului prin atingerea celor doi electrozi.

Pentru tensiuni mai mari aplicate electrozilor (zeci de kV) se realizează scânteia electrică, descărcare ce nu mai trebuie activată. Aceâsta deoarece are loc emisia la rece a electronilor din electrodul "negativ", emisie ce determină străpungerea electrică a intervalului dintre electrozi.

Tensiunea necesară pentru străpungerea stratului de aer dintre electrozi depinde de distanța d dintre ei, de gradul de umiditate al aerului, de forma electrozilor, starea suprafeței lor, natura lor etc, cei mai importanți factori fiind d și forma electrozilor. Pentru electrozii ascuțiți este nevoie de o tensiune mai mică decât pentru cei sferici.

Dăm mai jos câteva tensiuni necesare pentru declanșarea scânteii (a străpungerii) în cazul unor electrozi metalici sferici având diametrul de circa 10 mm (diametru indicat în analizele spectrale), aflați la diferite distanțe d.

d (mm)	1,5	3	4	6	9	24
U (V)	5000	10000	15000	20000	30000	70000

Temperatura ce se realizează într-o descărcare în arc este cuprinsă între 5500 şi 8000 K, pe când în cazul scânteii temperaturile realizate sunt cuprinse în intervalul 10000 şi 30000 K (temperatură electronică).

Introducerea atomilor în plasa descărcării în arc sau scânteie se face în mod simplu în cazul metalelor şi anume confecţionând unul din electrozi chiar din proba de analizat. Temperatura mare realizată cât şi bombardarea electrodului respectiv cu ioni pozitivi va produce evaporarea lui pe o anumită grosime (distanţă).

În cazul analizei unor materiale slab conductoare (roci etc) cu urme de metale, unul din electrozi se confecţionează din cărbune şi având un crater ce se umple cu o pulbere fină a acelei probe (Fig. 3). În cazul soluţiilor sărurile unor elemente pe care vrem să le punem în evidenţă (soluţii pe care, în unele cazuri, le obţinem "atacând" probele de analizat, nemetalice sau sub altă formă, cum ar fi rocile, cu acizi potriviţi astfel ca sărurile obţinute să se dizolve în apă), unul din electrozi, confecţionat

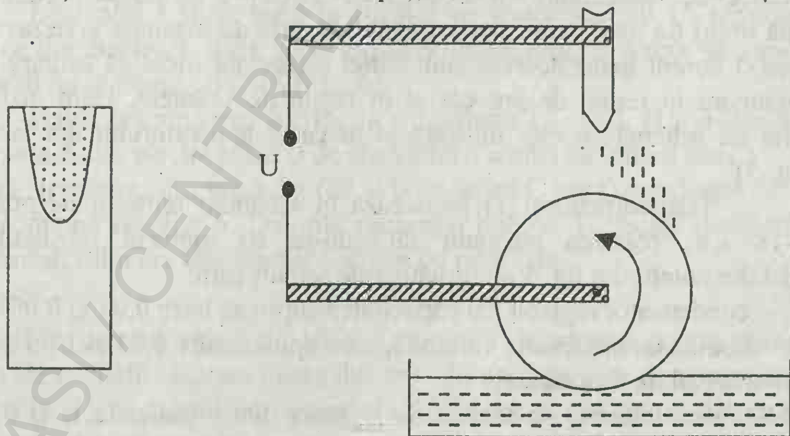


Fig. 3. Electrod scobit pentru pulberi.

Fig. 4. Un mod de a se antrena soluţia în spaţiul de descărcare.

dintr-un anumit metal se face sub forma unui disc care se roteşte trecând printr-un vas ce conţine soluţia respectivă. Datorită "umezirii" roţii soluţia va fi "proiectată" puţin câte puţin în spaţiul de descărcare (fig.4).

În arc se emit cu precădere linii atomice (numite şi linii de arc) pe când în scânteie, datorită temperaturii mai mari, vor apare şi linii ionice, emise de atomii simplu sau multiplu ionizaţi, numite linii de scânteie. În funcţie de acestea este mai comod să caracterizăm o descărcare electrică având în vedere şi scopul în care se utilizează ea. Vom spune că descărcarea are un caracter de arc când proba emite linii atomice şi că ea are un caracter de scânteie când se emit linii ionice.

Se utilizează arcul şi scânteia atât în curent continuu cât şi în curent alternativ. Descărcările în curent alternativ (la frecvenţa de 50 Hz), deci descărcări întrerupte, asigură stabilitatea şi reproductibilitatea lor, aceasta din cauză că electrozii nu sunt tot timpul fierbinţi. Acest lucru este foarte important în analizele cantitative, când trebuie să se înregistreze exact în aceleaşi condiţii (T acelaşi) atât spectrele etaloanelor cât şi a probei de cercetat.

S-au realizat multe tipuri de generatoare electrice (circuite electrice de "alimentare" a electrozilor) pentru a se putea produce cele două tipuri de descărcări, fiecare având o serie de avantaje şi dezavantaje. În mod curent generatoarele sunt astfel proiectate încât să asigure atât o descărcare în regim de arc cât şi în regim de scânteie. Dăm mai jos o astfel de schemă ce este utilizată şi în cazul generatorului din laborator (Fig. 5).

Transformatorul Tr realizează în secundar tensiuni de ordinul a 12-18 kV, reglarea tensiunii făcându-se cu ajutorul reostatului R. Celelalte notaţii din fig. 5 au următoarele semnificaţii:

C – condensator reglabil, cu capacitatea cuprinsă între 0,01 şi 0,001 μF,

L – bobină cu inductanţă variabilă, între aproximativ 0,01 şi 1 mH,

I – interval de descărcare,

M – motor electric ce realizează legătura dintre punctele E şi F, când lama ab vine în dreptul lor,

D – bobine ce protejează transformatorul împotriva pătrunderii curentului de înaltă frecvenţă de la circuitul de descărcare (B).

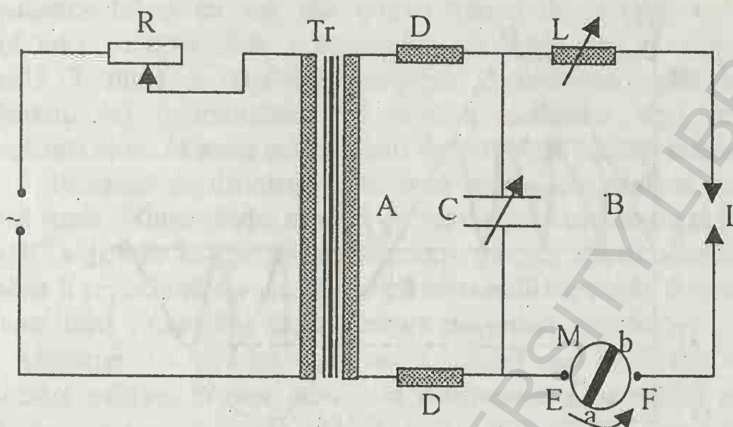


Fig. 5. Schemă de generator pentru alimentarea descărcării în arc sau scânteie.

Pentru început vom discuta mecanismul de funcționare al generatorului în lipsa motorului M şi când este realizată legătura electrică între punctele E şi F ale circuitului de descărcare.

Intervalul I fiind legat în paralel cu condensatorul C, tensiunea dintre ce doi electrozi, dacă nu ar exista străpungerea, ar trebui să varieze sinusoidal după curba OPQRS (Fig. 6).

Dacă străpungerea are loc la o tensiune $U_S < U_{max}$ (U_S depinzând de distanța dintre electrozi cât şi de alți factori) atunci pe timpul unei perioade, tensiunea din secundar (de la bornele lui C sau I) urmăreşte curba continuă din fig. 6. Datorită prezenței bobinei L fiecare descărcare a condensatorului are un caracter oscilant cu perioada:

$$T = 2\pi\sqrt{LC}\ ,$$

T având în general valori de 10^{-5}s. O singură descărcare poartă numele de tren de oscilații. Durata întregului tren de oscilații este de aproximativ 10^{-4} s (Fig. 7). Oscilațiile se amortizează din cauza rezistenței din circuit iar o parte din energia curentului electric se consumă pentru încălzirea electrozilor.

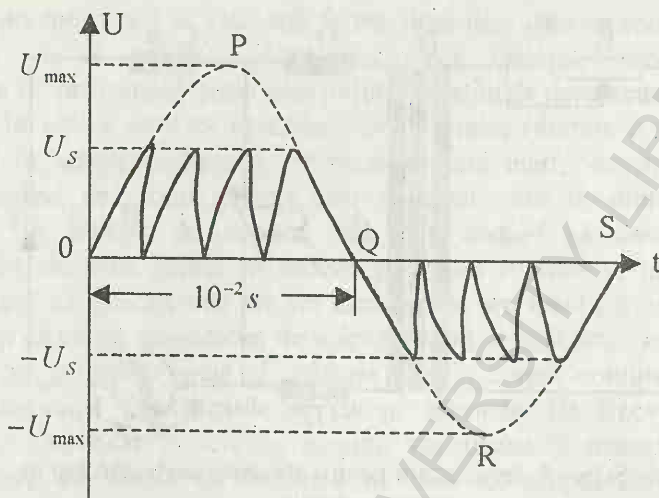


Fig. 6. Variația tensiunii de la bornele condensatorului C (sau dintre electrozi) în timpul descărcării

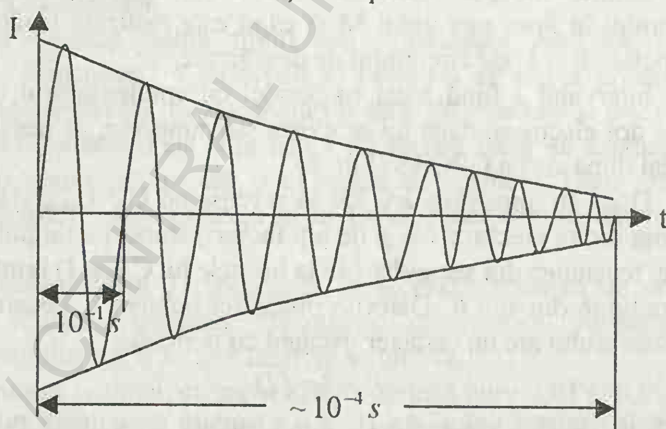


Fig. 7. Forma unui tren de oscilații.

După ce se termină trenul de oscilație condensatorul se încarcă din nou și începe un nou tren de oscilație. Cu cât e mai mare intervalul de descărcare, cu atât va fi nevoie de o tensiune mai mare pentru

străpungerea lui şi cu atât mai puţine trenuri de oscilaţii vor trece în timpul unei semiperioade a curentului alternativ. Pe de altă parte, o perioadă T mare a oscilaţiilor impune o descărcare mai înceată a condensatorului, o amortizare mai mică a oscilaţiilor, deci descărcarea durează mai mult. În acest caz numărul de trenuri de oscilaţii scade.

Procesul de descărcare, în cazul montajului analizat, se împarte în două stadii. Primul stadiu este cel de străpungere care durează între 10^{-7}–10^{-8} s şi este însoţit de luminescenţa gazelor din atmosferă. Stadiul al doilea îl reprezintă un arc de curent alternativ de înaltă frecvenţă şi de tensiune joasă (intervalul de descărcare devenind "conductor", tensiunea între electrozi va scădea). În acest stadiu se formează un canal conducător subţire, în care densitatea instantanee a curentului este foarte mare, ajungând până la 100-150 A/mm^2. În locul atingerii canalului cu suprafaţa electrozilor, are loc o degajare de scurtă durată a unei cantităţi mari de energie termică, ceea ce duce la încălzirea bruscă şi foarte rapidă a unei porţiuni mici de electrod. Procesul decurge atât de repede (între 10^{-5}-10^{-6} s) încât căldura nu reuşeşte să se disipeze în electrod şi, practic, întreaga energie a descărcării electrice se degajă în locul atingerii canalului cu electrodul. Substanţa electrodului este aruncată prin explozie în zona de descărcare. Aceste explozii se observă sub formă de jeturi de vapori luminescenţi ai substanţei, denumite flame sau făclii. În aceste flame se excită atomii proveniţi din electrozi.

Intensitatea momentană I a curentului electric care străbate spaţiul descărcării creşte cu valoarea capacităţii C şi cu tensiunea U aplicată la armăturile sale (pentru că odată cu ele creşte cantitatea de electricitate acumulată în condensator) şi scade proporţional cu perioada oscilaţiilor ce apar în circuitul oscilant, adică cu $\sqrt{LC}$. Deci se poate scrie:

$$I \approx U\sqrt{\frac{C}{L}}.$$

Mărirea tensiunii şi capacităţii va determina creşterea lui I (deci a temperaturii), ceea ce duce la intensificarea liniilor de scânteie, crescând de asemenea intensitatea spectrului aerului. Creşterea lui L va

duce la intensificarea liniilor de arc, scăzând şi intensitatea liniilor aerului.

În schema analizată, fără motorul M, producerea descărcării este dependentă de distanţa dintre electrozi şi de starea suprafeţei acestora. Aceşti parametri se modifică continuu ne putându-se asigura reproductibilitatea descărcării. Aceste neajunsuri sunt înlăturate prin intermediul descărcărilor comandate.

S-au imaginat mai multe scheme de comandă a descărcărilor, cea mai simplă şi mai eficientă fiind aceea propusă de Feussner. Ea este realizată de un întrerupător mecanic adus în stare de rotație de un motor sincron. Viteza motorului are o astfel de valoare încât contactele mobile a, b se apropie de contactele fixe E, F (Fig. 5) în fiecare semiperioadă a curentului alternativ ce alimentează condensatorul şi anume când tensiunea U atinge valoarea maximă, U_{max}. În acest mod se asigură descărcarea condensatorului C la aceeaşi tensiune de încărcare, în fiecare semiperioadă. Astfel, fiecare trecere a curentului se face în aceleaşi condiţii ceea ce asigură constanţa emisiei spectrale a sursei.

VI.1.3. Surse de excitare cu laseri.

Laserii sunt utilizaţi de obicei pentru evaporarea probelor prin focalizarea radiației laserului în punctul necesar al probei. În funcţie de energia şi puterea laserului se evaporă $10^{-8} - 2 \cdot 10^{-6}\,g$ de substanţă dintr-un crater cu diametrul de 20-200 µm. Excitarea se produce printr-o descărcare electrică prin plasma care se formează.

Instalaţia spectrală ce utilizează ca surse arcul, scânteia sau laserul este asemănătoare cu cea prezentată în fig. 1 (fotometrul cu flacără), în locul flăcării plasându-se sursa respectivă. Instalaţiile mai vechi, care se mai întâlnesc prin unele laboratoare, folosesc înregistrarea fotografică a spectrului, în care caz rolul celor trei componente monocromator-fotomultiplicator-înregistrator este preluat de un spectrograf, cu prismă sau cu reţea de difracţie.

În instalaţiile mai noi, numite cuantometre, detectorii de radiaţii (fotodiode) sunt plasaţi exact în locul unde sunt focalizate liniile de

analiză ale elementelor de interes, ca element dispersiv şi de focalizare utilizându-se o rețea de difracție curbată. Etalonarea instalației, pentru elementele ce urmează să fie analizate, fiind făcută de firma constructoare, concentrațiile din proba de analizat vor apare afişate pe ecranul aparatului, sau a calculatorului la care este cuplat..

VI.2. Principiile şi metodele analizei spectrale de emisie atomică.

Analiza spectrală de emisie atomică se bazează pe următoarele două principii:

a) Fiecare element are un spectru caracteristic format dintr-o succesiune de linii spectrale de lungimi de undă bine determinate (care se găsesc în tabelele de linii spectrale). Acest principiu stă la baza analizei spectrale calitative.

b)Intensitatea fiecărei linii spectrale depinde de concentrația atomilor din proba de analizat după o lege bine determinată. Acest principiu sta la baza analizei spectrale cantitative.

În legătură cu primul principiu lucrurile sunt deja clare, cunoscute de la alte cursuri, de aceea vom face câteva considerații relative la al doilea principiu.

În cazul când se neglijează contribuția emisiei stimulate (neglijare permisă în cazul surselor spectrale obişnuite, ca cele discutate în paragraful anterior) şi când nu se ține seama de fenomenele de autoabsorbție şi ionizare, intensitatea liniei spectrale de frecvență ν_{ik} (fig. 8) se poate scrie astfel:

(1) $$I_{ik} = N_i A_{ik} h\nu_{ik} = N_0 \frac{g_i}{g_0} e^{-\frac{E_i}{kT}} A_{ik} h\nu_{ik},$$

T fiind temperatura sursei de radiații.

Din relația de mai sus rezultă că cele mai intense linii sunt cele de rezonanță (indicate cu litera R) şi care corespund tranziției de pe primul nivel excitat pe nivelul fundamental $(E_0 = 0)$.

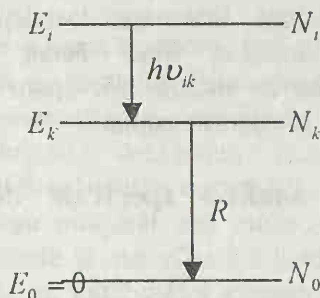


Fig. 8. Emisia liniei de rezonanţă R şi a unei linii oarecare υ_{ik}.

Deoarece metodele de analiză utilizând drept sursă spectrală arcul sau scânteia (şi care se aplică în special probelor solide) diferă întrucâtva de cele ce utilizează flacăra (şi care se aplică doar soluţiilor), le vom discuta separat, pe scurt.

VI.2.1. Consideraţii privind analiza probelor solide.

Dacă se ţine seama de faptul că la temperaturile ridicate din sursele spectrale (mai ales din cele de scânteie) are loc şi ionizarea unui anumit număr de atomi, atunci trebuie să avem în vedere faptul că concentraţia atomilor excitaţi scade, ceea ce influenţează intensitatea liniilor spectrale atomice. Numărul ionilor care se formează în descărcare, în condiţii de echilibru termodinamic, este dat de relaţia:

$$N^* = \frac{N_0}{N_e} \frac{(2\pi m_0)^{3/2} (kT)^{5/2}}{h^3} e^{-\frac{eV}{kT}},$$

unde: N_e – concentraţia electronilor, V – potenţialul de ionizare al atomilor, N_0 – concentraţia atomilor din plasmă.

Dacă se ţine seama de gradul de ionizare x, definit ca raportul dintre numărul de ioni N^* şi numărul total de atomi N_i, intensitatea unei linii spectrale în lipsa autoabsorbţiei va fi dată de relaţia:

$$I_{ik} = (1 - x) N_i \cdot A_{ik} h \nu_{ik}.$$

De aici rezultă că odată cu creşterea temperaturii sursei

intensitatea liniei spectrale la început creşte (datorită creşterii lui N_i, pentru x=0), atinge un maxim pentru o anumită temperatură optimă, caracteristică fiecărui element, după care scade datorită creşterii gradului de ionizare x. Poziţia maximului de intensitate, în scara (I,T), depinde de potenţialul de excitare al liniei şi de potenţialul de ionizare al atomului respectiv. De exemplu liniile spectrale ale atomilor metalelor alcaline, a căror potenţiale de excitare sunt de 1-2 eV, au intensitatea maximă la 3000-4000 K.

Luarea în considerare şi a autoabsorbţiei complică lucrurile astfel că în final se obţine o formulă destul de complicată, ce conţine o serie de constante ce nu pot fi determinate.

Pe de altă parte, datorită proceselor care au loc la electrozi (în cazul probelor solide mai ales), în timpul descărcării compoziţia vaporilor nu este identică cu compoziţia probei. Procese ca: formarea unui strat de oxid, difuzia prin acest strat, volatilitatea diferită a elementelor sau a combinaţiilor lor etc, complică legătura dintre N_0 şi concentraţia C a unui element din probă. În majoritatea cazurilor, după un timp (numit timp de prescânteie) se stabileşte însă un regim regulat (echilibru dinamic), când între concentraţiile elementelor din plasma descărcării şi din electrozi există o relaţie de proporţionalitate.

Toate acestea ne arată că din punct de vedere teoretic nu se poate găsi o relaţie cantitativă dintre intensitatea liniilor spectrale şi concentraţie, se poate stabili doar o dependenţă calitativă (cu coeficienţi nedeterminaţi).

Dependenţa intensităţii liniilor spectrale de concentraţia C se poate exprima prin următoarea formulă empirică:

(2) $$I = aC^b,$$

a şi b fiind nişte constante ce depind de o serie de factori, constanta „b" depinzând în primul rând de autoabsorbţie, iar „a" în primul rând de temperatură.

Logaritmând expresia de mai sus se obţine:

(3) $$\lg I = b \lg C + \lg a;$$

dependenţa numită şi "curba de creştere".

Experienţa arată că dependenţa (2) are forma din fig. 9. Această

alură a curbei se explică prin faptul că coeficientul b nu este constant (autoabsorbţia nu este aceeaşi) ci variază cu concentraţia C a elementului.

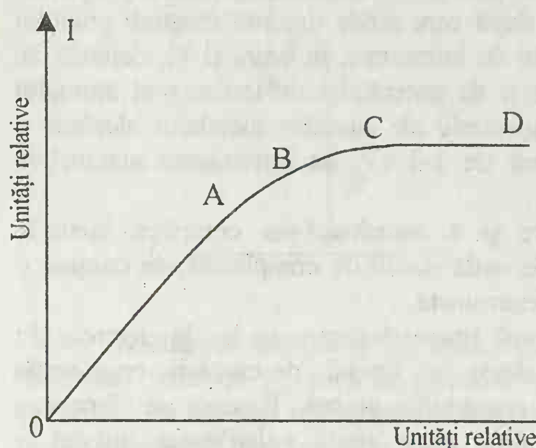


Fig. 9. Dependenţa intensităţii unei linii spectrale de concentraţia atomilor din probă.

În cazul concentraţiilor mici b=1 (porţiunea OA a curbei), iar în cazul măririi lui C, b se micşorează până la anulare. Pentru porţiunea AB: b=0,8, pentru BC: b=0,4 , iar pentru porţiunea CD: b≈0.

Autoabsorbţia se manifestă cel mai puternic la liniile cu potenţiale de excitare mici şi mai ales la liniile de rezonanţă, cele mai intense şi mai sensibile; ele se mai numesc şi linii ultime, deoarece dispar ultimele din spectru la scăderea concentraţiei elementului.

Pentru determinarea unui element, în cazul concentraţiilor mici ale acestuia, se alege de obicei o linie de rezonanţă; totuşi ea nu poate fi folosită la concentraţii mai mari, deoarece intensitatea acestei linii încetează să mai depindă de concentraţie. Liniile cu potenţiale de excitare mai mari nu sunt bune pentru determinarea cantităţilor mici, deoarece pentru ele se obţin curbe de creştere bruşte, datorită absenţei autoabsorbţiei.

În concluzie, pentru fiecare interval de concentraţie trebuie aleasă linia potrivită. De obicei intervalul în care se reuşeşte să se folosească una şi aceeaşi linie pentru determinări cantitative nu depăşeşte variaţia concentraţiei de 100 ori.

Din cele spuse rezultă că graficul de mai sus nu poate fi obținut pe cale teoretică ci doar pe cale experimentală folosind etaloane cu diverse concentrații C, cunoscute, ale elementului ce urmează să fie determinat. Un astfel de grafic se numeşte grafic de etalonare. Acesta ne permite, în principiu, determinarea unei concentrații necunoscute. Graficul de etalonare se trasează fie în coordonatele (I, C), când concentrația C este foarte mică, fie în coordonatele ($\log I$, $\log C$), la concentrații mai mari.

Totuşi, o serie de factori cum ar fi cei legați de procesele de evaporare a probelor, "jocul" luminii arcului sau scânteii pe suprafața electrozilor, mărimea şi forma suprafeței electrozilor, mărimea intervalului dintre electrozi, oscilațiile în regimul electric al sursei, modificări a sensibilității receptorilor de radiații, fac aproape imposibilă reproducerea tuturor condițiilor în care se înregistrează spectrele etaloanelor şi a probei de cercetat, perturbând deci dependența intensității liniei de concentrație.

Pentru a înlătura influența acestor factori se alege din probă un element al cărui conținut este invariabil, denumit standard intern. De exemplu, când se analizează conținutul de elemente dintr-o probă de oțel (un aliaj al fierului cu alte metale) ca standard intern se va alege Fe. Aceasta deoarece concentrația lui, de peste 90% în diversele probe de oțel, se poate considera constantă în raport cu celelalte elemente de aliere. Intensitatea liniilor standardului va suferi aceleaşi variații, din partea tuturor factorilor menționați mai sus, ca şi intensitatea liniilor elementului supus determinării. Raportul, R, dintre intensitatea unei linii a elementului ce se determină şi intensitatea unei linii a standardului va depinde numai de concentrația acelui element.

Pe lângă factorii perturbatori pomeniți mai sus, care nu duc la modificări sensibile ale temperaturii arcului sau scânteii, pot interveni şi alții care duc la modificarea acestei temperaturi, cum ar fi variațiile şi oscilațiile accidentale în regimul electric al sursei. Pentru eliminarea şi acestor variații se alege o pereche de linii cu potențialele de excitare egale sau apropiate. O astfel de pereche de linii poartă denumirea de pereche de linii omoloage sau pereche de linii analitice. Pentru o astfel de

pereche vom avea dependenţe asemănătoare cu (2) sau (3) şi anume:

$$R = aC^b, \qquad \lg R = \lg a + b \lg C.$$

VI.2.2. Consideraţii privind analiza soluţiilor.

Analiza calitativă a soluţiilor se simplifică prin faptul că în flacără se excită un număr mic de linii ale elementelor prezente în probă, în principal a celor de rezonanţă, identificarea acestor elemente fiind mai uşoară. În tabelul 1 se dau liniile de emisie cele mai importante utilizate în fotometria cu flacără, pentru elementele care se pot determina calitativ şi cantitativ prin această metodă.

Tabelul 1. Liniile de emisie cele mai importante pentru elementele care se pot determina în fotometria de flacără.

Elementul	Lungimi de undă, în nm		
Ag	328,1	338,3	
Ba	553,6	744,0 (O)	873,0 (O)
B	452,0 (O)	548,0 (O)	345,0 (O)
Ca	422,7	554,0 (O)	622,0 (O)
Co	346,6 (M)	353,0	387,4
Cr	360,5	427,5 (M)	425,5
Cs	455,5	852,1	894,3
Cu	324,8	327,4	520,0 (O)
Fe	373,7 (M)	386,0 (M)	385,6 (M)
K	404,7 (D)	766,5 (D)	344,6 (D)
Li	670,8	460,3	323,3
Mg	285,2	371,0 (O)	383,0 (O)
Mn	403,3 (M)	543,3	279,5
Na	330,3 (D)	589,3 (D)	818,3 (D)
Ni	341,5 (M)	352,5 (M)	385,8 (M)
Pb	368,4	405,8	261,4 (D)

Tabel 1, continuare.

Rb	420,2 (D)	780,0	794,8
Sn	460,7	821,0 (O)	407,8
Ti	377,6	535,0	276,8

S-a notat cu: (O) - benzile de emisie ale oxizilor, (M) - grupe de linii, (D) - dublete de linii

Analiza cantitativă se poate face, în principiu, trasând câte o curbă de etalonare (intensitatea semnalului obţinut pentru linia de emisie în funcţie de concentraţie) pentru fiecare element de interes din proba de cercetat, bine înţeles doar în cazul elementelor ce se pot excita în flacără.

În acest scop analistul are la dispoziţie seturi de etaloane pentru diverse elemente, de concentraţii precis determinate, în mod obişnuit de 1g/l, adică 1ml soluţie etalon conţine 1mg de element. Menţinând exact aceleaşi condiţii de lucru la fotometrul cu flacără ca şi la trasarea curbelor de etalonare, concentraţia necunoscută a unui element din probă s-ar putea determina cu ajutorul curbei de etalonare corespunzătoare.

Lucrurile nu sunt aşa de simple cum par la prima vedere. Aceasta din cauza unui ansamblu de fenomene, numite interferenţe, întâlnite atât în cazul probelor solide, dar care se manifestă mai pregnant în cazul analizelor probelor sub formă de soluţii. Prin interferenţe se înţelege totalitatea fenomenelor fizice şi chimice care acţionează asupra atomilor elementului care se determină, având ca rezultat o modificare a semnalului pe care aceştia l-ar da în lipsa lor.

Interferenţele chimice constituie categoria cea mai importantă de interferenţe. Orice reacţie care duce la scăderea sau la creşterea numărului de atomi liberi constituie cauza unei interferenţe chimice. Astfel de reacţii se produc în flacără. Din acest motiv trasarea curbei de etalonare trebuie făcută în condiţii identice cu acelea impuse de probă, respectiv în fiecare soluţie etalon să existe toate elementele componente în probă. Dacă realizarea unor etaloane similare cu proba nu este posibilă, se pot aprecia interferenţele prin compararea rezultatelor obţinute cu proba cu acelea obţinute prin metoda adaosurilor. În situaţia că nu există nici o interferenţă, între cele două rezultate nu trebui să apară

deosebiri semnificative.

Pentru a aprecia influenţa exercitată de un element străin asupra speciei ce se determină, se măsoară semnalul pentru o concentraţie medie pe curba de etalonare şi semnalul pentru aceeaşi concentraţie după adăugarea unor cantităţi crescânde din elementul interferent.

Interferenţele chimice pot să deranjeze foarte mult, în special când duc la scăderea semnalului analitic, întrucât afectează limita de detecţie şi nu permit determinarea concentraţiilor mici. În aceste cazuri se poate recurge fie la separarea elementelor ce dau interferenţe, lucru de obicei laborios, fie la adăugarea unor substanţe chimice care blochează acţiunea elementului interferent. Un exemplu clasic îl constituie introducerea sărurilor de lantan în soluţiile în care se dozează calciu pentru a înlătura perturbarea produsă de SO_4^{2-}.

VI.2.3. Problemă practică de laborator. Determinarea calciului din apa potabilă prin metoda fotometriei în flacără.

Metoda se pretează cel mai bine pentru determinarea unor cantităţi mici de calciu (sub 1 ppm) din ape, în prezenţa unor cantităţi mari de sulfat, silice şi bicarbonat, fără separări chimice prealabile.

Interferenţele produse de silice şi de ionii Na^+, K^+, Al^{3+}, SO_4^{2-} şi PO_4^{3-} se elimină prin adăugarea unor săruri de magneziu. În acelaşi timp interferenţa ionului bicarbonic se elimină prin adăugarea de acid percloric. Interferenţa aluminiului, fierului şi titanului se elimină prin precipitarea cu o soluţie de $NH_4OH - NH_4Cl$. Interferenţa anionilor SO_4^{2-}, PO_4^{3-} şi CO_3^{2-} se poate elimina cu ajutorul schimbătorului de ioni Dowex 2-X8.

Se recomandă ca fotometrările să fie efectuate pentru linia de rezonanţă având $\lambda = 422,7nm$. Curbele de etalonare se vor construi utilizând soluţia etalon standard ce conţine 1g Ca la 1 *l* soluţie.

Pentru a şti ce concentraţii ale Ca avem nevoie pentru construirea curbei de etalonare se ia o cantitate foarte mică din soluţia etalon-standard, de exemplu 1 ml şi se dizolvă în 9 ml apă bidistilată. Se

compară semnalul obţinut la fotometru în cazul acestei soluţii, pentru linia $\lambda = 422{,}7 nm$, cu semnalul dat de apa potabilă, la aceeaşi lungime de undă. Dacă între cele două semnale există diferenţe mari se fac diluţiile corespunzătoare ale soluţiei etalon până se aduc cele două semnale la valori apropiate. În acest fel se poate stabili concentraţia medie pentru construirea curbei de etalonare. Celelalte concentraţii se recomandă să difere de concentraţia medie cu aproximativ $\pm 10 mg/l$.

Pentru orientare dăm mai jos concentraţia calciului, exprimată în carbonat de calciu, pentru diverse ape potabile:

- ape dulci: $C < 50 mg/l$.
- ape cu duritate slabă: $C \cong 100 - 150 mg/l$.
- ape cu duritate moderată: $C \cong 150 - 300 mg/l$.
- ape foarte dure: $C > 350 mg/l$.

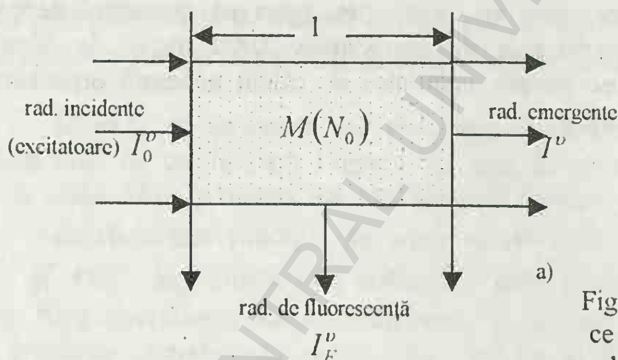
În încheiere vrem să facem precizarea că necesarul de calciu pentru corpul omenesc este de aproximativ 1000 mg/zi. În afară de consumul de produse lactate, cantitatea de calciu necesară organismului provine din apa potabilă.

Cap. VII. Analiza spectrală utilizând absorbţia şi fluorescenţa atomică (ASAA şi ASFA).

Deoarece în prezent cele două tipuri de analize spectrale se efectuează cu acelaşi aparaţ spectral (numit Spectrofotometru de absorbţie şi fluorescenţă atomică) vom analiza aceste metode în paralel.

VII.1. Principiile metodelor ASAA şi ASFA.

Fie o „cuvă" M de grosime l, "umplută" cu atomi liberi aflaţi în starea fundamentală E_0 (de obicei o flacără sau un cuptor electric): fig.1 a). Fie I_0^ν intensitatea radiaţiilor excitatoare, I^ν a celor emergente şi I_F^ν a celor de fluorescenţă, frecvenţa ν corespunzând tranziţiei de rezonanţă $E_0 \rightarrow E_1$ (Fig.1 b).



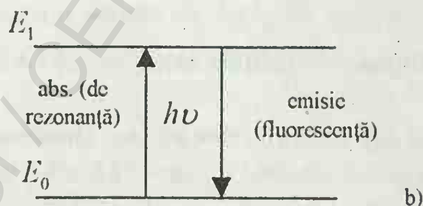


Fig. 1. Sistem atomic ce absoarbe şi emite radiaţia de rezonanţă.

Să considerăm că in cuvă se află No atomi, presupuşi a fi toţi în starea fundamentală, aceasta deoarece la temperaturile ce se realizează într-o flacăra popularea termica a nivelului E_1, cât şi a celor superioare se poate neglija.

VII.1.1. Principiul metodei ASAA.

Intensitatea radiaţiilor emergente din cuvă va fi dată de legea Lambert:

(1) $$I^{\nu} = I_0^{\nu} e^{-k_{\nu} \ell},$$

k_{ν} fiind coeficientul de absorbţie al mediului format din atomii respectivi. Mărimea $\frac{I^{\nu}}{I_0^{\nu}} = T^{\nu}$ se numeşte transmitanţă iar:

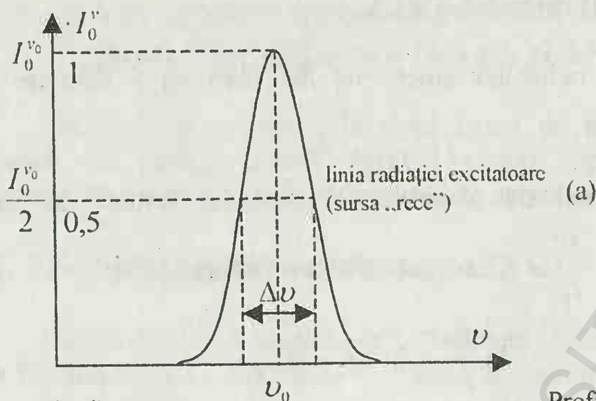
(2) $$\lg \frac{I_0^{\nu}}{I^{\nu}} = k_{\nu} l \lg e = E^{\nu},$$

se numeşte extincţie (uneori se utilizează denumirea de absorbanţă sau densitate optică).

De obicei I^{ν}, I_0^{ν}, T^{ν} şi E^{ν} se scriu fără ν deasupra, subînţelegându-se că aceste mărimi depind de fapt de frecvenţa ν.

Radiaţia excitatoare de frecvenţă ν poate fi obţinută fie cu o sursă spectrală conţinând aceeaşi atomi ca şi cei din "cuvă" (adică cu o sursă cu spectru de linii, de exemplu o lampă cu vapori de Na, în cazul când în M se află atomi de Na), fie cu o sursă având un spectru continuu în combinaţie cu un monocromator.

În ambele cazuri trebuie să se ţină seama că linia excitatoare are un anumit profil, adică o anumită lărgime Δν (denumire dată de fapt pentru semilărgimea liniei): fig. 2 a). În cazul utilizării unei surse cu spectru de linii (surse atomice) această lărgime este determinată în principal de lărgimea Doppler alături, bineînţeles, de lărgimea naturală. În cazul utilizării unei surse cu spectru continuu, Δν depinde de lăţimea fantelor monocromatorului cât şi de frecvenţa ν, când monocromatorul este cu prismă. În această situaţie Δν poartă denumirea de lărgime a benzii transmise de monocromator (sau a benzii de trecere a monocromatorului).



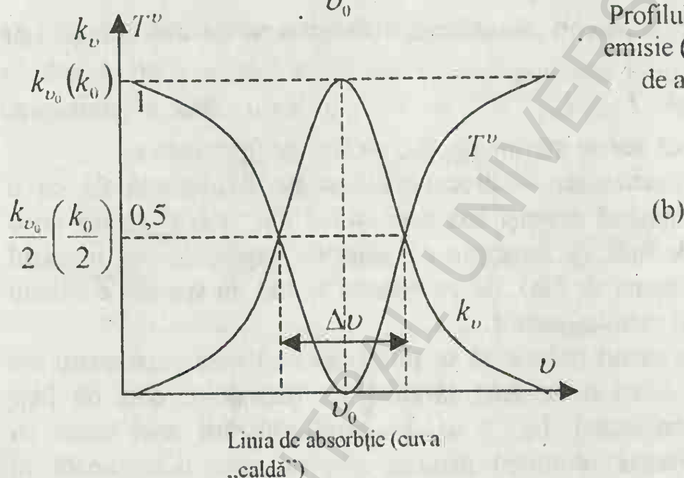


Fig. 2.
Profilul unei „linii" de emisie (a) și a unei linii de absorbție (b).

Profilul liniei de absorbție atomică (dependența de ν a lui k_ν, E sau a lui T) este datorat acelorași cauze ca și profilul liniei de emisie atomice. Având în vedere faptul că temperatura ce se realizează în sursele spectrale atomice utilizate în ASAA și ASFA (vezi mai jos) este mult mai mică decât în cuva M, linia de absorbție va avea o lărgime Δν mai mare decât cea de emisie (fig. 2 b).

Mărimea $\int_0^\infty k_\nu d\nu$, egală cu aria mărginită de conturul liniei, poartă denumirea de coeficient de absorbție integrală. Teoria arată că,

independent de procesele care determină conturul liniei de absorbţie, atât coeficientul de absorbţie integrală cât şi coeficientul de absorbţie k_0 „la centrul liniei" depind direct proporţional cu numărul N_0 a atomilor absorbanţi, cele două mărimi fiind exprimate prin relaţiile:

(3) $$\int_0^\infty k_\nu d\nu = \frac{\pi e^2}{m_0 c} N_0 f,$$

(4) $$k_0 = \frac{b}{\Delta \nu} \frac{\pi e^2}{m_0 c} N_0 f,$$

unde e şi m_0 sunt respectiv sarcina şi masa electronului, c viteza luminii în vid, iar f reprezintă tăria oscilatorului armonic pentru frecvenţa respectivă, $\Delta \upsilon$ este semilărgimea liniei spectrale de absorbţie iar b este un coeficient constant pentru toate liniile spectrale ale aceluiaşi element în condiţiile experimentale date.

Tăria oscilatorului armonic reprezintă numărul mediu de electroni per atom care pot fi excitaţi cu o radiaţie de frecvenţă ν. Pentru metalele din grupele I şi II f este cuprins între 0,7 şi 1, iar pentru liniile mai intense ale celorlalte elemente f are valori între 0,4 şi 0,5.

Relaţiile de mai sus stau la baza a două metode de ASAA: una bazată pe măsurarea absorbţiei integrale $\int_0^\infty k_\nu d\nu$, alta bazată pe măsurarea coeficientului de absorbţie k_0 la centrul liniei de absorbţie.

Pentru aplicarea primei metode avem nevoie de o sursă ce emite un spectru continuu şi de un monocromator de mare putere de rezoluţie astfel încât Δν (sau Δλ) pentru radiaţia excitatoare să fie mult mai mic decât Δν (sau Δλ) a liniei de absorbţie. Teoria arată că în condiţiile create în mod curent pentru transformarea substanţei în stare de vapori atomici şi anume temperaturi de 2000-4000°C şi presiuni de o atmosferă sau mai mici, Δλ≈0,01Å. Astfel, de exemplu, dacă linia utilizată la măsurători are λ=5000 Å, pentru trasarea precisă a conturului liniei trebuie să utilizăm un aparat cu puterea de separaţie $\frac{\lambda}{\Delta\lambda} \cong 500.000$, adică un monocromator cu mare putere de rezoluţie. Astfel de monocromatoare performante, dar şi ieftine în acelaşi timp, au apărut doar de câţiva ani. Din acest motiv ASAA s-a bazat la început pe cea de-a doua metodă, ce nu necesită

utilizarea unui monocromator de mare putere de rezoluţie, în cazul când în calitate de sursă de radiaţii se folosesc lămpi spectrale capabile să emită radiaţii monocromatice înguste. Aceste cerinţe sunt îndeplinite de lămpile spectrale cu catod cavitar, ce vor fi descrise în paragraful următor. Ceea ce se cere de la monocromator în această a doua metodă este doar capacitatea lui de a separa linia de rezonanţă, aleasă în calitate de linie analitică, de alte radiaţii prezente în spectrul sursei de radiaţii (un număr relativ mic de linii). O situaţie asemănătoare întâlnim în cazul filtrelor pentru liniile mercurului.

Principiul măsurării lui k_0 (de fapt a unei mărimi proporţionale cu extincţia E^{ν_0}) este ilustrat în fig. 3, unde A este conturul liniei spectrale de absorbţie, B - conturul liniei de emisie al lămpii spectrale, Tr - banda de trecere a monocromatorului, D_1,...D_6 - contururile unor linii sau benzi spectrale prezente în spectrul de emisie al lămpii.

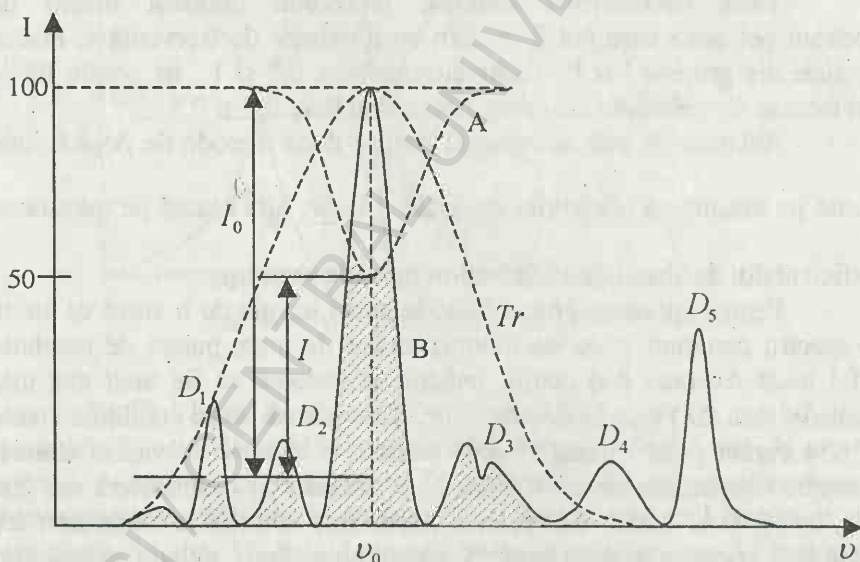


Fig. 3. Principiul măsurării absorbţiei în centrul liniei de emisie.

Dacă monocromatorul se fixează pe frecvenţa υ_0, corespunzătoare centrului liniei de emisie a unei anumite specii de atomi,

pentru aceasta se va obţine semnalul maxim (curba B). În cazul când această radiaţie este absorbită de atomi de aceeaşi specie, linia de absorbţie A (având maximul tot la υ_0) se va „suprapune" pentru linia B ca în figură. Raportul „intensităţilor" benzilor B şi A va fi egal, desigur, cu raportul dintre numărul de atomi ce emit linia υ_0 şi numărul de atomi ce o absorb. Extincţia măsurată în centrul liniei, $E_c^{\upsilon_0}$, o mărime proporţională cu E^{υ_0}, este de fapt logaritmul raportului dintre doi termeni - unul dat de suma intensităţilor tuturor liniilor din interiorul benzii de trecere a monocromatorului (banda Tr) şi alt termen mai mic decât primul cu aria „scoasă" din linia B în urma absorbţiei (zona ne haşurată a liniei B).

Natural că a doua metodă se poate utiliza şi în cazul când se foloseşte o sursă cu spectru continuu cu condiţia ca $\Delta\nu$ a benzii transmise de monocromator să fie mai mică decât lărgimea benzii de absorbţie.

Se arată că sensibilitatea unei măsurători de absorbţie atomică ce utilizează a doua metodă este condiţionată de raportul dintre lărgimea liniei de absorbţie şi lărgimea liniei radiaţiei excitatoare. Sensibilitatea este cu atât mai bună cu cât acest raport este mai mic. Practic se consideră potrivit un raport mai mic de 1/3.

Dacă ţinem seama că $E_C^{\upsilon_0} \sim E^{\upsilon_0}$ şi că N_0, numărul de atomi absorbanţi ai unui anumit element prezenţi în „cuva" cu atomi, este proporţional cu concentraţia acelui element din proba de analizat, adică $N_0 \sim C$, din relaţiile (2) şi (4) se obţine:

$$(5) \qquad E_C^{\upsilon_0} \sim E^{\upsilon} = k_0 l \lg e \sim \frac{b\pi e^2 f}{\Delta\upsilon m_0 c} N_0 \sim \frac{b\pi e^2 f}{\Delta\upsilon m_0 c} C .$$

Deoarece în relaţia care leagă extincţia E de concentraţia C intervin mărimi care nu pot fi determinate suficient de simplu şi precis rezultă că pe baza acestei relaţii nu se pot face determinări absolute de concentraţii (fără etaloane). De aceea sunt necesare seturi de etaloane de concentraţii cunoscute, pentru fiecare element de determinat.

Conform formulei (5) există o relaţie de directă proporţionalitate între extincţia E măsurată „în centrul liniei" şi concentraţia C. Experienţa arată însă că legătura liniară dintre E şi C se păstrează pentru valori ale lui E ce nu depăşesc 0,3- 0,5 (fig. 4).

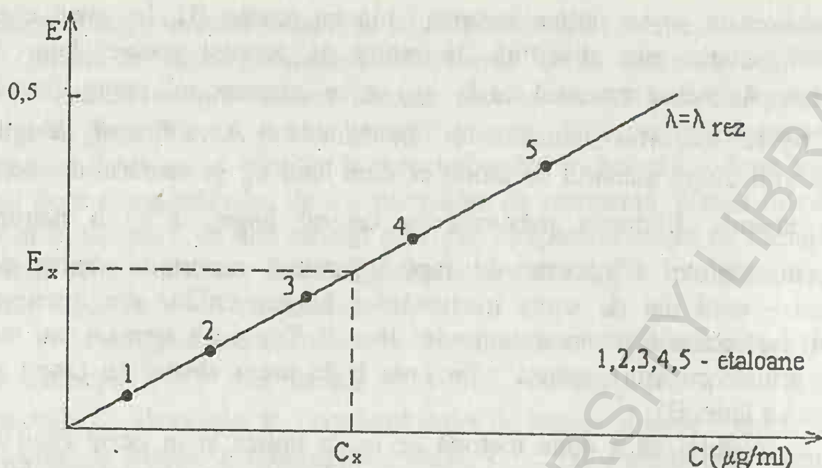


Fig. 4. Forma curbei de etalonare pentru domeniile de concentraţie pentru care $E \in (0{,}3 - 0{,}4)$.

Deci dacă, pentru setul de etaloane avut la dispoziţie, se trasează o dependenţa ca în figura 4, concentraţia cunoscută C_x se va scoate direct din grafic, măsurând în prealabil extincţia E_x.

Se recomandă ca setul de etaloane să fie astfel ales încât concentraţia C_x să fie situată în domeniul de concentraţie al etaloanelor (între concentraţiile C_1 şi C_5). Pentru a se respecta şi condiţia recomandată pentru E, adică $0{,}3 < E < 0{,}5$, soluţia probei necunoscute se poate dilua sau concentra într-un raport cunoscut.

Cea mai indicată linie spectrală pentru măsurători va fi desigur cea de rezonanţă, ea fiind cea mai intensă linie emisă de atomii probei.

VII.1.2. Principiul metodei ASFA.

Teoria arată că şi între intensitatea I_F^υ a radiaţiilor de fluorescenţă şi concentraţia C a atomilor din "cuvă" (şi din probă) există, pentru anumite intervale de concentraţii, o relaţie de directă proporţionalitate. Relaţia teoretică este însă foarte complicată deoarece pentru calculul lui I_F^υ trebuie să se ţină seama atât de profilurile liniei

excitatoare şi de absorbţie cât şi de fenomenul de autoabsorbţie din cuvă.

În unele situaţii este util calculul intensităţii ideale a fluorescenţei atomice, făcându-se următoarele presupuneri:

a) o anumită tranziţie de fluorescenţă pe care o luăm în considerare este excitată prin absorbţie de radiaţii „monocromatice” (linie spectrală),

b) toată celula de fluorescenţă este în interiorul unghiului solid văzut de detector, adică fluorescenţa este captată de la toţi atomii excitaţi de radiaţia incidentă,

c) radiaţia de fluorescenţă nu este pierdută prin reabsorbţie în celulă.

În aceste condiţii intensitatea integrală a fluorescenţei (a unei anumite linii, de obicei linia de rezonanţă, pentru tot conturul ei), în direcţie normală la radiaţia excitatoare, va fi:

(6) $$I_F = I_0 W \frac{\Omega}{4\pi} A_T \varphi_F \ ,$$

unde : I_0 este intensitatea radiaţiilor excitatoare, pentru toată lărgimea liniei respective (a liniei de emisie a sursei):

$$I_0 = \int_{\text{linie de emisie}} I_0^\nu d\nu \ ,$$

- W este lărgimea fasciculului de radiaţii excitatoare (vezi fig. 5),
- Ω este unghiul solid din care este captată şi măsurată radiaţia de fluorescenţă,
- A_T este factorul de absorbţie totală pentru linia spectrală ce excită fluorescenţa: .

$$A_T = \frac{\int_{\text{linia de abs}} \left(I_0^\nu - I_0^\nu e^{-k_\nu \ell}\right) d\nu}{I_0} \ ,$$

- φ_F reprezintă randamentul cuantic al fluorescenţei, definit ca raportul dintre numărul de fotoni emişi şi numărul de fotoni absorbiţi de atomii cuvei (sau numărul mediu de fotoni emişi ce revin unui atom în cazul când acesta a absorbit un foton din radiaţia excitatoare) – această mărime este caracteristică atomilor de o anumită specie.

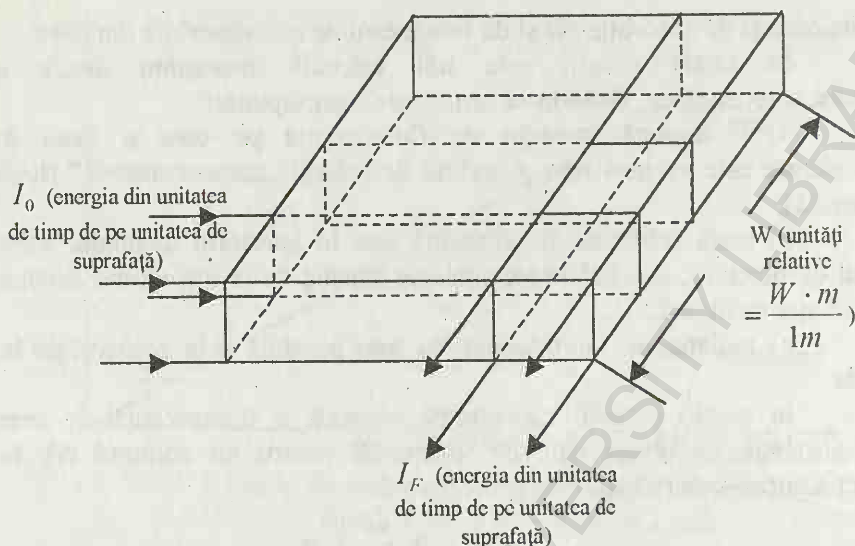


Fig. 5. Explicarea faptului că $I_F \sim W$ (W =lărgimea fasciculului de radiații excitatoare, exprimată în unități relative).

Calculul lui A_T se face pentru două situații limită și anume când linia radiației excitatoare este mai largă decât linia de absorbție (situație întâlnită când sursa de radiații excitatoare emite un spectru continuu sau o linie foarte lățită prin fenomenul de autoabsorbție și când bineînțeles, nu se utilizează un monocromator de mare putere de rezoluție) și a doua situație, când linia excitatoare este mai îngustă decât linia de absorbție.

Curbele analitice prezise de ecuația (6) sunt date, pentru cele două cazuri, în fig.6.

Se observă că pentru fiecare din cele două cazuri curba analitică are două porțiuni liniare – una pentru concentrații mici și alta pentru concentrații mari.

Relația (6) poate fi aplicată în următoarele două cazuri:

a) Când reabsorbția radiației de fluorescență este neglijabilă, adică la concentrații foarte mici ale atomilor,

b) La orice concentrație, pentru fluorescența directă și uneori pentru alte tipuri de fluorescență nerezonantă, când nivelul inferior al tranziției de fluorescență este îndeajuns de sus față de nivelul fundamental, pentru

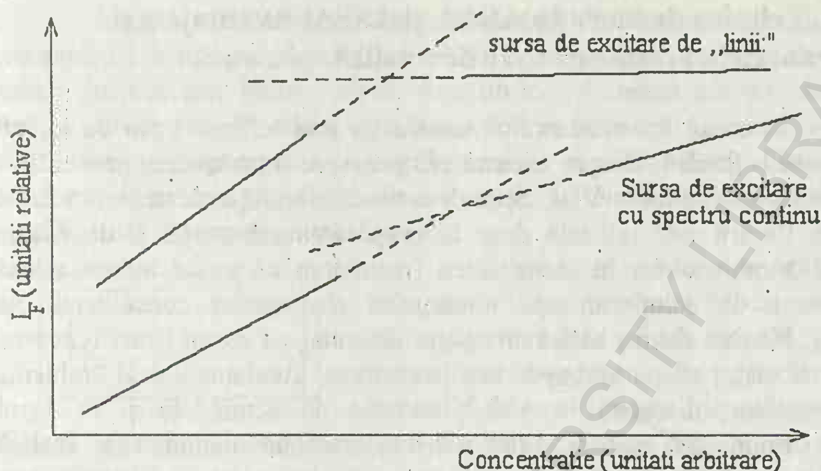


Fig. 6. Curbe analitice (de etalonare).

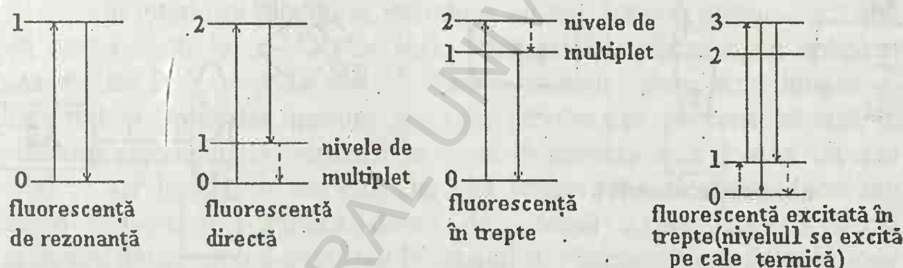


Fig. 7. Tipuri de fluorescență atomică. Indicele 0 se referă la starea fundamentală iar indicii 1, 2, 3, la stările excitate.

ca populaţia lui de echilibru să fie mică.

Tipurile posibile de fluorescență atomică sunt prezentate în diagramele din fig. 7. Liniile punctate reprezintă tranziţiile neradiative.

Măsurătorile în ASFA sunt mai simplu de efectuat decât în ASAA deoarece ele se reduc doar la determinarea intensităţii I_F a liniei de fluorescență, de obicei o linie de rezonanță. Şi în cazul ASFA trebuie utilizate o serie de etaloane de concentrații cunoscute cu ajutorul cărora se trasează o curbă de etalonare. În cazul acesta I_F se va măsura în unități relative (număr de diviziuni la instrumentul detectorului de radiații) căci măsurarea lui I_F în unități absolute (W/m^2) este foarte dificilă.

VII.2. Tehnica de lucru în ASAA şi ASFA. Avantajele şi dezavantajele acestor metode de analiză spectrală.

În cazul spectrometrelor uzuale (şi mai ieftine) cuva cu atomii liberi este o flacără. Despre aceasta cât şi despre introducerea probei într-o flacără s-a discutat în VI.1. Spre deosebire de situaţia de acolo, în cazul de faţă flacăra este utilizată doar la evaporarea substanţei şi disocierea termică a moleculelor în atomi liberi (reamintim că proba trebuie adusă sub formă de soluţie în apă a sărurilor elementelor constituente ale probei). Flacăra devine astfel un spaţiu delimitat, cu atomi liberi (cuvă cu atomi liberi), aflaţi aproape toţi în starea fundamentală. Problema interferenţelor, discutată în V.2.2, rămâne de actualitate şi în cazul acestor tipuri de analize. Principiile celor două metode de analiză spectrală rezultă din fig. 8.

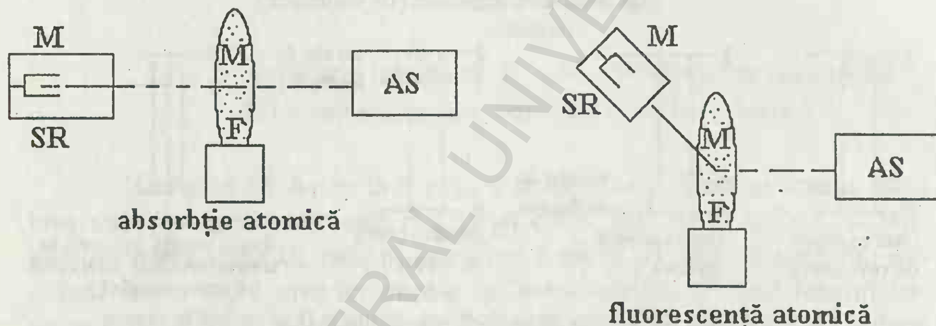
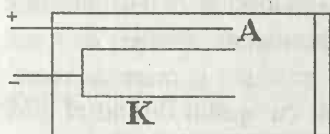


Fig. 8. Principiile metodelor ASAA şi ASFA.

- SR = sursă de radiaţii (lampă cu catod cavitar) ce emite radiaţii provenite de la o anumită specie de atomi M, aceeaşi pe care vrem să o punem în evidenţă în flacără, adică în probă.
- AS = aparat spectral – un ansamblu format din monocromator, detector, amplificator şi înregistrator.

Sursa de radiaţii utilizată în ASFA trebuie să fie mai intensă decât cea de la ASAA deoarece trebuie să se excite un număr cât mai mare de atomi astfel încât radiaţia de fluorescenţă emisă să poată fi detectată. Din acest motiv spectrometrele de absorbţie şi fluorescenţă atomică sunt prevăzute cu două seturi de lămpi – un set pentru ASAA şi altul pentru ASFA.

Lampa cu catod cavitar (alimentată în curent continuu) are avantajul că este uşor de realizat şi alimentat, având deci costul relativ scăzut. În plus este foarte stabilă. Această lampă constă din doi electrozi închişi într-un tub de sticlă, aceasta având o fereastră de cuarţ sau din sticlă pirex (transparentă la radiaţiile vizibile şi ultraviolete). Catodul K are forma unui mic tub închis la un capăt, iar anodul A constă dintr-o simplă sârmă uneori cu un inel la capăt:



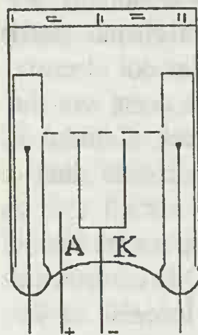
Catodul se confecţionează (când este posibil) din elementul M, ce urmează să fie determinat în probă. În cazul că din respectivul element nu se poate prelucra un astfel de catod, atunci se utilizează un aliaj al acestuia. Uneori elementul de determinat se depune sub forma unei căptuşeli în interiorul unui catod fabricat dintr-un material adecvat. Pentru anod se utilizează sârme din wolfram sau nichel.

În interiorul tubului se introduce un gaz nobil la presiune scăzută (de obicei neon la p~1-2 mm Hg). Între cei doi electrozi se aplică o tensiune de 200 până la 500 V. Pentru anumite relaţii între lungimea, diametrul şi presiunea gazului din tub, descărcarea se concentrează în interiorul catodului (cilindrului). În urma descărcării apar ioni ai gazului nobil ce vor bombarda catodul. Datorită vitezei mari ale acestor ioni are loc o pulverizare catodică destul de intensă a acestuia. Ciocnirile ulterioare dintre atomii expulzaţi în spaţiul din interiorul catodului şi ionii ce se îndreaptă spre acesta vor da naştere la atomii M excitaţi, care vor emite radiaţii caracteristice.

Deoarece presiunea dintr-o lampă cu catod cavitar este foarte mică, lărgimea liniilor spectrale este determinată în întregime de efectul Doppler, temperatura din lampă fiind practic egală cu temperatura camerei. În cazul când este nevoie să se obţină linii foarte înguste catodul cavitar se răceşte cu azot lichid.

Lampa descrisă mai sus este folosită de obicei în ASAA, intensitatea radiaţiilor ce se obţin cu ajutorul ei ne fiind suficientă pentru ASFA.

Pentru mărirea intensităţii lămpii prezentate mai sus se utilizează electrozi auxiliari, ca în exemplul din figura de mai jos.



Cei doi electrozi auxiliari sunt dispuşi în interiorul unor tuburi de sticlă care au câte o deschidere situată la câtiva mm deasupra catodului. Cei doi electrozi sunt acoperiţi cu un material ce emite uşor electroni. La trecerea curentului între anod şi catod se formează în faţa acestuia din urmă un nor de vapori atomici. În acest moment se declanşează o a doua descărcare, la o tensiune mai scăzută, dar de mare intensitate, între cei doi electrozi auxiliari. Aceasta produce o mare densitate de electroni ce se vor ciocni cu atomii din norul aflat în faţa catodului. Energia furnizată de descărcarea auxiliară duce la o importantă creştere a intensităţii liniilor atomice (de precizat că descărcarea primară se efectuează la circa 2-20 mA, pe când descărcarea secundară la 100-300 mA).

Aparatul spectral AS nu trebuie să înregistreze şi radiaţiile emise de flacără, care pot fi datorate fie unor molecule sau ioni proveniţi din carburant, comburant sau din combinarea acestora, fie speciilor M excitate termic (în special atomi ai unor elemente cu potenţial de excitare mic). Prezenţa acestor radiaţii "parazite" ar duce la o neliniaritate a curbelor analitice.

Această dificultate se poate înlătura printr-un procedeu de amplificare selectivă propus de A. Walsh, unul dintre întemeietorii ASAA. În acest scop fasciculul de radiaţii emis de sursa spectrală se modulează în amplitudine cu o anumită frecvenţă, cu ajutorul unui dispozitiv de modulare mecanic, electric sau optic. Mai nou se utilizează un întrerupător în circuitul de alimentare al lămpii cu catod cavitar. După trecerea prin monocromatorul aparatului spectral, fasciculul luminos ajunge pe fotoreceptor, de exemplu catodul fotomultiplicatorului, iar curentul fotoelectric dat de acesta este amplificat cu ajutorul unui amplificator selectiv cu bandă de trecere îngustă, acordat pe frecvenţa de modulare, apoi este detectat şi măsurat. În aceste condiţii radiaţia emisă de flacără, ne fiind modulată, determină un curent fotoelectric continuu care nu este amplificat de către amplificatorul selectiv şi astfel este eliminată în mod automat.

Radiaţia flăcării fiind eliminată măsurătorile de extincţie se fac

în felul următor: se fixează la aparatul spectral linia analitică ce urmează să fie înregistrată, de obicei o linie de rezonanţă a speciilor M. Se pulverizează în flacără apă distilată (solventul) şi se fixează extincţia la valoarea zero (corespunzătoare intensităţii I_0 a radiaţiilor incidente pe cuvă).

Se pulverizează apoi soluţia în apă distilată a sării elementului M şi se citeşte valoarea extincţiei în acest caz (corespunzătoare intensităţii I a radiaţiilor ce ies din cuvă; trebuie de precizat că aparatul spectral posedă un circuit electronic ce permite determinarea şi afişarea extincţiei: $E = \log\frac{I_0}{I} = \log I_0 - \log I$).

În cazul fluorescenţei atomice măsurătorile se fac mai simplu deoarece trebuie determinate doar intensităţi (în unităţi relative).

Avantajele ASAA sunt următoarele:

a) Variaţia temperaturii sistemului în care se produc vaporii atomici (flacăra sau alte sisteme) nu are un efect însemnat asupra rezultatelor analizei spectrale, cum se întâmplă în cazul emisiei atomice. Aceasta deoarece în ASAA se măsoară absorbţia radiaţiilor de rezonanţă, produse de către atomii din starea fundamentală şi a căror concentraţie nu variază practic cu temperatura, când aceasta variază în limite suficient de largi.

b) Deoarece se măsoară absorbţia radiaţiilor de rezonanţă de către atomii din starea fundamentală, puternic populată, sensibilitatea metodei pentru determinarea elementelor greu excitabile este aproape la fel de mare ca sensibilitatea ei pentru elementele uşor excitabile.

c) Datorită fineţii liniilor spectrale şi a fondului continuu foarte slab în radiaţia emisă de către lămpile folosite în ASAA se asigură o selectare bună a liniilor de rezonanţă analitice, chiar cu ajutorul unor aparate spectrale cu o putere de rezoluţie relativ mică.

d) În timp ce în spectroscopia de emisie atomică intensitatea radiaţiilor nu poate fi mărită mult prin extinderea dimensiunilor sursei de radiaţii, datorită intensificării fenomenului de autoabsorbţie (care duce şi la lărgirea liniilor, pe lângă micşorarea intensităţii în centrul lor), pentru ASAA sensibilitatea măsurătorilor creşte proporţional cu lungimea drumului parcurs de fasciculul de radiaţii prin mediul absorbant. Ţinând seama de aceasta, la unele tipuri de spectrometre de absorbţie atomică se

utilizează un sistem de oglinzi pentru ca radiaţia excitatoare să traverseze de mai multe ori flacăra.

e) Utilizarea probelor sub formă lichidă înlătură fenomenul de distilare fracţionată care complică mult analiza spectrală prin emisie atomică, introducând erori importante.

Dezavantajele ASAA, în cazul majorităţii aparatelor existente, sunt următoarele:

a) Pentru fiecare element de analizat este necesară o sursă spectrală construită pentru acel element.

b) Metoda nu poate fi utilizată pentru determinarea unor elemente care au liniile de rezonanţă în domeniul spectral sub 2000 Å, ele fiind puternic absorbite în flacără şi aer.

c) Analiza probelor solide nu se poate efectua de obicei decât după dezagregarea şi aducerea lor sub formă de soluţii.

O serie de avantaje ale ASAA rămân valabile şi în cazul ASFA (a, b, d şi e). Pe lângă acestea ASFA mai prezintă următoarele avantaje:

a) Sensibilitatea măsurătorilor creşte cu creşterea intensităţii sursei utilizate la excitare.

b) Pot fi folosite şi surse de lumină cu spectru continuu sau cu linii destul de largi, fără o scădere pronunţată a sensibilităţii ca în cazul ASAA.

c) Aparatura utilizată nu este prea complicată, deci nu prea costisitoare.

Dezavantajele ASFA sunt cam aceleaşi ca şi în cazul ASAA.

Dezavantajul a) a fost parţial înlăturat în ultimul timp prin construirea unor lămpi spectrale al căror catod este confecţionat dintr-un aliaj al mai multor elemente (cel mult trei), alese în aşa fel încât să nu existe "interferenţe" între ele: liniile analitice să nu fie foarte apropiate, prezenţa unui element să nu modifice graficul de etalonare pentru celălalt element etc.

Dezavantajul c) este înlăturat în prezent prin înlocuirea flăcării cu un cuptor de grafit având temperatura strict controlată (şi care este foarte scump) iar dezavantajul a) se prevede să fie înlăturat în viitorul apropiat prin utilizarea unor monocromatoare de mare putere de rezoluţie, în care caz este suficientă o singură sursă de radiaţii şi anume o sursă ce emite un spectru continuu (de exemplu o lampă cu Xenon).

VI.3. Probleme practice de laborator. Determinarea metalelor în materialele biologice.

a) Determinări de metale în serul sangvin.

Calciu, magneziu, potasiu, sodiu.

Conținutul normal al acestor metale în ser este cuprins între următoarele valori: calciu 9,0-11,0 mg% (4,5-5,5 mEq/l); magneziu 1,8-3,1 mg% (1,5-2,5 mEq/l); sodiu 310-356 mg% (135-155 mEq/l) și potasiu 14,4-22,4 mg% (3,6-5,6 mEq/l). Pentru determinări de calciu, magneziu și potasiu serul se diluează în raport de 1:20 cu o soluție de clorură sau azotat de lantan. Pentru determinarea sodiului serul se diluează numai cu apă distilată în raport de 1:50. Etaloanele se fac cu apă distilată.

Fier. Conținutul fierului în ser variază între $50\mu g\%$ (0,5 ppm) și $150\mu g\%$ (1,5 ppm). În pregătirea probei se precipită proteinele cu acid tricloracetic. Într-o eprubetă de centrifugă se introduce 1ml de probă care se tratează cu 1ml soluție 20% de acid tricloracetic și se ține pe o baie de apă la 90^0C timp de 15 minute. Se centrifughează și lichidul limpede de deasupra se poate fotometra. În vederea preparării etaloanelor trebuie avut în grijă că diluarea să se facă tot cu soluție de acid tricloracetic.

Litiul. Acest element se dozează în intervalul 0,5-1mEq/l, fiind suficientă diluarea probei în proporție de 1:9 cu apă distilată.

Cuprul și zincul se găsesc în ser în concentrație de $70-140\mu g\%$ (0,7-1,4 ppm) cupru și $50-120\mu g\%$ (0,5-1,2 ppm) zinc. Pregătirea probei de ser în vederea determinării este foarte simplă și constă în diluarea cu apă distilată în proporție de 1:1 pentru cupru și 1:4 pentru zinc. Etaloanele se separă plecând de la o soluție de 500 ppm cupru, respectiv zinc, care se diluează cu o soluție de glicerol 10% în apă distilată.

Clorul poate fi dozat indirect prin precipitare cu azotat de argint urmată de determinarea excesului de argint. Conținutul normal de clor în ser este cuprins în intervalul $340-390\mu g\%$ (95-110 mEq/l).

Soluțiile etalon se prepară pornind de la o soluție de bază de 1000 mEqCl^-/l (5,845 g NaCl la 100 ml apă distilată) și o soluție de azotat de argint obținută din 1,000 g azotat de argint dizolvat în apă,

tratat cu 30 ml acid azotic şi adus la 1 litru. Din soluţia de clorură se prepară un şir de soluţii diluate de 90, 100, 110 şi 120 mEq/l. O cantitate de 0,5 ml ser se tratează cu 10 ml de soluţie de azotat de argint după care se agită şi se centrifughează.. În lichidul de deasupra se fotometrează argintul, în condiţiile de lucru indicate pentru aceasta. Etaloanele se prelucrează în acelaşi mod ca şi proba.

c) Determinări de metale în urină.

Calciul, magneziul, potasiul şi sodiul pot fi determinate fără o prelucrare prealabilă a probei, în afara unei diluări cu apă distilată în următoarele proporţii: 1:50 pentru calciu, 1:200 pentru magneziu, 1:2000 pentru potasiu şi 1:5000 pentru sodiu. Etaloanele se prepară cu apă distilată.

Litiul se află în urină, în mod normal la concentraţii între 2,5 şi 15 mEq/l. Pentru determinare, proba se diluează în proporţie de 1:99 cu apă distilată.

Plumbul este un component a cărui determinare este importantă pentru prevenirea bolilor profesionale. Întrucât cantitatea de plumb ce se găseşte în mod normal în urină (0,01-0,04 ppm) este foarte mică, se procedează la o concentrare prin complexare şi extracţie. În acest scop, 100 ml urină se tratează cu 1 ml acid clorhidric concentrat, după care 25 ml din proba tratată se aduce la pH 2,5-3,0 cu hidroxid de sodiu 5%. Se trece torul printr-un tub de centrifugă de 50 ml, se adaugă 1 ml soluţie proaspăt preparată de pirolindinditiocarbamat de amoniu 2% în apă distilată şi apoi 5 ml metilizobutilcetonă, după care se agită şi se centrifughează. Faza organică se separă şi se fotometrează.

Când nu este posibilă determinarea prin extracţie, se poate recurge la coprecipitarea cu ajutorul unei soluţii de azotat de bismut 10%. 25 ml probă de urină se aduce într-un tub de centrifugă, preferabil din material plastic, se adaugă 1 ml soluţie 10% bismut şi apoi se ajustează pH-ul la aproximativ 9, adăugând circa 0,5 ml hidroxid de amoniu, după care se centrifughează timp de 10 minute. Se decantează lichidul de deasupra şi se adaugă 2 ml acid clorhidric, trecând precipitatul cantitativ într-o capsulă de teflon sau platină. Se încălzeşte uşor până când se dizolvă, apoi se transferă soluţia într-un balon cotat de 5 ml şi se completează la semn. Se realizează astfel o concentraţie de 5 ori a

plumbului. Pentru a realiza o concentrare de 10 ori, se pleacă de la proba de urină de 50 ml.

O serie de date necesare efectuării analizelor se prezintă în tabelul 1.

Tabel 1. Date necesare efectuării analizelor de elemente prin metoda de absorbție atomică, utilizând flacăra acetilenă-aer.

Elementul	Linii spectrale recomandate (λ nm)	Sensibilitate (ppm)	Cine produce interferențe. Observații.
Ca	422,67 239,86	0,05	Al, Be, Ti, V, Zn, Si şi anionii fosforic, sulfuric şi silicic
Cu	324,75 327,40	0,07	Nu are practic interferențe
Fe	248,33 252,28 372,0	0,08	Si, Ca, Sr, Al, Mn şi acizii organici. Acizi anorganici nu influențează determinările
Li	670,78 610,36 323,26	0,02	Anionii de orice fel. Deoarece se ionizează uşor este preferabilă emisia atomică
Mg	285,21 279,55 202,58	0,006-0,007	Na, K, Ca, Al, Si, P, Li, Ti, Zn şi diverşi anioni. Fe, Mn şi MO în concentrații mari
Pb	283,31 261,42 217,0	0,12	Anionii şi Ni, Cr, Mo, Mn, Si care interferează într-o mică măsură. Interferența anionilor poate fi eliminată prin adaos de EDTA
Zn	213,86 307,59	0,015	Nu are interferențe
Na	589,0 589,59 330,20	0,004	Ca şi acizi minerali. Se preferă determinarea prin emisie în flacără

VII.4. Descrierea spectrofotometrului de absorbţie atomică AAS-1 şi a modului de lucru la acesta.

Schema optică a spectrofotometrului AAS-1 este prezentată în fig. 9.

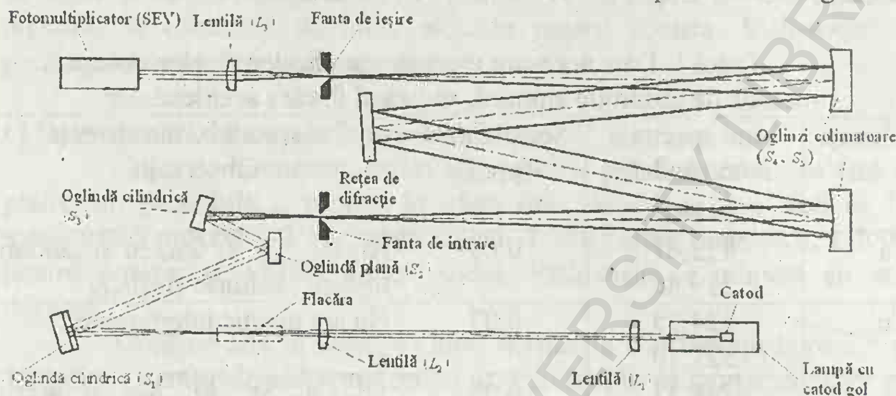


Fig. 9. Schema optică simplificată a spectrofotometrului AAS-1.

Radiaţia emisă de lampa cu catod gol este focalizată cu ajutorul lentilelor L_1 şi L_2 pe flacără, apoi cu ajutorul oglinzilor S_1, S_2 şi S_3 pe fanta de intrare a monocromatorului, ce are ca element dispersiv o reţea de difracţie. Radiaţia având lungimea de undă ce interesează este focalizată cu ajutorul lentilei L_3 pe fotomultiplicator (SEV).

Schema electrică nu mai este prezentată fiind mai complicată. Rolul diverselor componente electrice se va înţelege (cu aproximaţie) urmărind principalele reguli de lucru la aparat.

Vederea din faţă a aparatului, unde se află cele mai importante butoane de reglare sau conectare, sunt prezentate în fig. 10.

Cele mai importante reguli pentru lucrul la spectrofotometrul pentru absorbţie şi emisie atomică AAS-1.

A. Verificări preliminare.

1. Se verifică dacă robinetele 12 (pentru acetilenă, din dreptul inelului galben) şi 16 (pentru aer, din dreptul inelului alb) sunt închise, adică dacă sunt date maximum la dreapta.

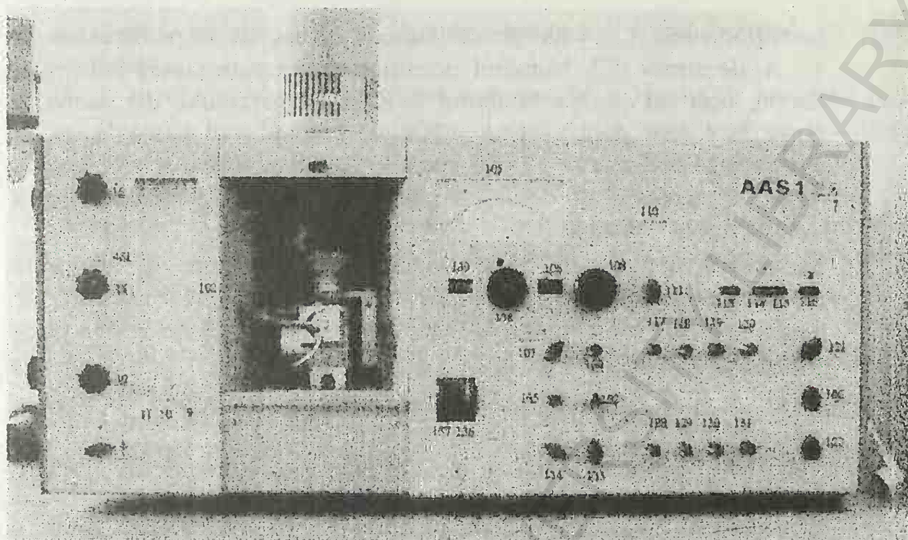


Fig. 10. Vederea din față a spectrofotometrului AAS-1.

2. Se verifică dacă comutatorul 4 este pe cercul galben (acetilenă).
3. Se verifică nivelul apei din vasul de condensare (sticla de jos din spatele aparatului) şi dacă tubul de legătură cu aparatul se află în sticlă.
4. Se verifică dacă robinetul de la compresor este închis (dacă e dat maxim în dreapta). Se pune apoi compresorul în priză pentru a se crea în vasul acestuia presiunea necesară pentru lucru.

B. Utilizarea aparatului pentru absorbția atomică.

1. Se rabatează capacul aparatului spre perete apoi se montează lampa necesară într-unul din cele 4 locaşuri, rotindu-se tamburul 7 (lateral dreapta, ce are marcate cifrele de la 1 la 4, corespunzând lămpilor din locaşurile cu acelaşi număr). Lampa dorită trebuie adusă în poziția „dreapta jos", în dreptul paralelipipedului lung şi negru. Dacă lampa s-a montat corect cifra de pe soclul acesteia trebuie să corespundă cu cifra de pe tamburul 7, ce apare în dreptul punctului negru marcat pe fața laterală a aparatului.
2. Se conectează spectrofotometrul apăsând butonul 116.
3. Se alimentează lampa necesară la una din sursele de tensiune ⏻1 sau ⏻2, acționând fie butonul 121, fie butonul 122, rotindu-le până se aprinde lampa.
4. Se reglează curentul de descărcare din lampa cu catod cavitar (astfel încât să nu se depăşească curentul maxim indicat pe lampă) de la

potențiometrele 1,...,4 ale primei surse, ⏻1, sau de la potențiometrele 1,...,4 ale sursei ⏻2. Numărul potențiometrului corespunde numărului lămpii, deci cel citit pe tamburul 7. Reglarea curentului din lampă se poate face doar dacă se ține apăsat fie butonul 114 (dacă lampa se alimentează de la sursa ⏻1) fie butonul 115, dacă lampa se alimentează de la ⏻2. Curentul de descărcare, în mA, se citeşte pe scala de jos a instrumentului principal 105.

5. Se fixează, aproximativ, lungimea de undă λ a liniei de rezonanță corespunzătoare elementului de determinat (sau a unei alte linii indicate pentru analiză), rotind tamburul 138, λ citindu-se în geamul 139. Dacă $700nm > \lambda > 400nm$ se utilizează filtrul de ordine 1 (cel transparent) ce se introduce într-un locaş de lângă arzător. Dacă $\lambda > 700nm$ se utilizează filtrul de ordine 2 (roşu).
6. Cu ajutorul tamburului 108 se alege o fantă cât mai mică, de exemplu 0,05 mm, valoarea ei citindu-se în geamul 106.
7. Se fixează comutatorul 107 pe treapta 0-100A.
8. Cu ajutorul potențiometrului 126 (SEV) se fixează tensiunea optimă de alimentare a fotomultiplicatorului, aceasta fiind corespunzătoare poziției 4 a comutatorului 126 (dacă este necesar, tensiunea de pe fotomultiplicator poate fi mărită sau micşorată).
9. Cu ajutorul comutatorului 134 se alege o anumită treaptă de amplificare a semnalului, la început una cât mai mică: 1 sau 2.

   Obs. Când se efectuează operațiile 8 şi 9 trebuie avut grijă ca acul instrumentului 105 să nu iasă din scală.
10. Fixarea exactă a lungimii de undă de analiză se face rotind uşor tamburul 138, în apropierea valorii puse la punctul 6, astfel încât curentul indicat de 105 să fie maxim.

    Obs. Valorile indicate de instrumentul 105 pe scala ϑ (a transmisiilor) pot fi citite şi pe ecranul numărătorului universal, conectat la spectrofotometru.
11. Se recomandă ca butonul 133, al constantei de timp, să fie pe treapta 0,5.
12. Se fixează arzătorul pentru analizele de absorbție atomică, respectiv cel cu trei fante lungi.
13. Se deschide robinetul lateral al compresorului (cel de sub manometru) învârtindu-l spre stânga.
14. Se verifică debitul optim al aerului rotind butonul 16 uşor spre stânga. Debitmetrul de aer 11 trebuie să indice diviziunea 481; dacă nu se indică această diviziune se roteşte butonul mare (lateral stânga) din

dreptul inelului alb. Se închide apoi aerul rotind butonul 16 spre dreapta.

15. Se deschide robinetul de înaltă presiune de la butelia de acetilenă (cel deasupra buteliei) cât şi robinetul mic de la reductorul de presiune, ultimul rotindu-l spre stânga.
16. Se observă câteva secunde manometrul de joasă presiune de la reductorul buteliei, dacă aceasta indică o presiune constantă. În felul acesta am verificat etanşietatea conductelor şi a racordurilor prin care este alimentat arzătorul cu acetilenă.
17. Se dă din nou drumul la aer rotind butonul 16 spre stânga.
18. Se dă drumul şi la acetilenă rotind butonul 12 uşor spre stânga iar după circa 10 secunde se aprinde flacăra. Debitmetrul de la acetilenă (din dreptul cercului galben) trebuie să indice aproximativ diviziunea 102. Dacă nu se indică această diviziune se acţionează butonul mare, lateral stânga, din dreptul cercului galben. Flacăra trebuie să aibă o culoare albăstruie în partea de jos.
19. Se pulverizează în flacără apă bidistilată (solventul) şi se aduce acul indicator al instrumentului 105 la diviziunea 0, pe scala E, sau la diviziunea 100, pe scala ϑ, manevrând butoanele 134 şi 108.
20. Rotind tamburul 137 (ce deplasează arzătorul pe verticală) şi tamburul 136 (ce deplasează arzătorul pe orizontală) se fixează poziţia optimă a arzătorului. Aceasta va corespunde situaţiei când pe scala ϑ, de exemplu, se obţine deviaţia cea mai mare.
21. Pentru aducerea exactă la diviziunea 0 sau 100 a instrumentului 105 se apasă pe butonul 113 „AUTO". Instrumentul de măsură 110 ne arată dacă se dispune de energia necesară acestei reglări.
22. Se pulverizează soluţia ce conţine elementul ce ne interesează (de măsurat) şi se citeşte valoarea lui ϑ pe scala 105 sau la numărător. Dacă valoarea indicată este între 90-100% (ceea ce înseamnă că elementul de analizat are o concentraţie mică, producând deci şi o absorbţie mică), butonul 107 se va pune în dreptul indicaţiei 90-100, astfel că scala se va multiplica cu factorul 10, crescându-se precizia de citire. Dacă valoarea indicată de instrumentul 105, pe scala ϑ, este între 80-100%, sau 50-100%, se va pune butonul 107 în dreptul indicaţiilor corespunzătoare, multiplicarea scalei făcându-se cu factorul 5, respectiv 2. Dacă concentraţia elementului de analizat e prea mare, obţinându-se valori mici pentru ϑ, se va dilua soluţia cu apă bidistilată, în rapoarte cunoscute, până când se va obţine pentru ϑ o valoare cuprinsă, de

preferință, între 50% și 30%, în care caz: $0{,}3 < E < 0{,}5$.

23. Pentru determinarea concentrației elementului de analizat din probă trebuie construită o curbă de etalonare, utilizându-se o soluție etalon a acelui element (a cărui concentrație este precis determinată). Se vor face diluții consecutive ale unei cantități mici din soluția etalon stoc ce conține 1g element pe litru soluție (de exemplu 0,2 ml; necesitatea de lichid pentru o măsurare fiind de circa 0,3 ml) până când se obține pentru ϑ o valoare apropiată de 50% $(E \cong 0{,}5)$. Plecând de la această ultimă soluție se mai fac două soluții, pentru a se obține pentru ϑ, valori apropiate de 40% și 30%, putându-se astfel construi curba de etalonare. În abscisă se va lua concentrația (în mg/l) iar în ordonată transmisia ϑ (în procente). În intervalul pomenit pentru ϑ curba de etalonare va fi o dreaptă.

   Obs. Este bine să avem unele informații asupra concentrației aproximative a elementului de determinat din probă, pentru ca analiza să decurgă mai rapid.

   De exemplu concentrația Ca din apa de băut este între circa 20 mg/l (în cazul apei dulci) și circa 120 mg/l în cazul apelor cu o duritate moderată. Concentrația magneziului în cazul unei ape potabile obișnuite este de circa 10 mg/l.

24. La sfârșitul măsurătorilor se închide robinetul de înaltă presiune de la butelia de acetilenă lăsând flacăra să ardă până se consumă acetilena de pe conducte și flacăra se stinge. Se închide apoi și robinetul de la reductorul de presiune.

25. Se închid apoi și robinetele 12 și 16, apoi se închide robinetul de la compresor, după care acesta se scoate din priză.

26. După ce potențiometrele acționate de butoanele 126 și 134 se aduc la valoarea minimă se întrerupe alimentarea aparatului de la butonul 116.

C. Utilizarea aparatului pentru emisie atomică (ca fotometru cu flacără).

Unele operații sunt cele de la partea **A**, de aceea pentru acestea vom indica numărul utilizat acolo.

1'=2, 2'=5, 3'=6

4'. Se pune comutatorul 107 în poziția E (emisie). În această poziție a comutatorului trebuie să se audă zgomotul produs de un mic motoraș ce rotește modulatorul mecanic (în regim de absorbție atomică modularea semnalului lămpii se făcea cu un circuit electronic, prin întreruperea tensiunii de alimentare a acesteia).

5'=8, 6'=9, 7'=10, 8'=11

9'. În locul arzătorului cu trei fante lungi se fixează arătorul tubular.

10'=13, 11'=14, 12'=15, 13'=16, 14'=17, 15'=18

16'. Se pulverizează soluția standard având concentrația maximă. Cu ajutorul comutatoarelor 134 şi 126 se alege o astfel de treaptă de amplificare, respectiv o astfel de tensiune pe fotomultiplicator, încât acul instrumentului 105 să arate valoarea „100". Reglajul fin al acestei valori se va face cu ajutorul tamburului 108, prin modificarea lățimii fantei.

Obs. Dacă nu se cunoaşte concentrația maximă a soluției etalon ea se poate stabili astfel:

- se pulverizează soluția de măsură şi se procedează aşa cum s-a specificat la 16', astfel ca acul instrumentului 105 să indice o valoare de mijloc, de exemplu diviziunea 50. Dacă nu se poate face reglajul corespunzător, evitându-se să se lucreze cu fante prea mici (sub 0,05 mm), se diluează soluția într-un raport cunoscut,
- se face operația 17',
- se pulverizează din nou soluția de măsură şi cu ajutorul butonului 132 se stabileşte din nou diviziunea 50,
- cu o cantitate mică din soluția etalon (de exemplu 0,2 ml) se fac soluții în apă distilată (20 ml) din ce în ce mai diluate până când semnalul obținut cu acestea este de aproximativ 100 diviziuni,
- ultima din soluții se consideră soluția etalon de concentrație maximă,
- se reia reglajul precizat la 16'.

17'. Se pulverizează apă distilată apoi cu ajutorul butonului de „0", 135, se aduce acul instrumentului 105 la „0".

18'. Se pulverizează din nou soluția etalon de concentrație maximă şi cu ajutorul butonului de „100", 132, se reglează valoarea „100" pe instrumentul de măsură 105.

19'. Plecând de la soluția etalon de concentrație maximă, prin diluții cu apă bidistilată, se mai fac încă trei soluții etalon având astfel de concentrații încât semnalul obținut să fie de aproximativ 75, 50 şi 25 diviziuni.

Obs. După fiecare măsurătoare e bine să se verifice originea scalei (punctul de „0") pulverizând apă bidistilată.

20'. Se trasează curba de etalonare: diviziuni-concentrație.

21'. Pulverizând din nou soluția de măsură se citeşte valoarea semnalului pe 105 apoi se scoate din curba de etalonare concentrația elementului de determinat.

Cap. VIII. Analiza bazată pe spectrele moleculare de absorbţie din infraroşu (IR).

VIII.1. Frecvenţe caracteristice de grup şi structura moleculară.

Vibraţiile moleculelor pot fi studiate, precum se ştie, şi în cadrul teoriei clasice utilizând modele mecanice. Astfel, pentru descrierea mişcărilor de vibraţie ale moleculelor poliatomice se folosesc modele mecanice alcătuite din mase sferice (bile) proporţionale cu masele atomilor respectivi. Bilele sunt legate între ele prin resorturi a căror lungime şi constantă elastică sunt proporţionale cu distanţele interatomice şi cu forţele legăturilor chimice corespunzătoare. Unghiurile dintre legături sunt aceleaşi, în model, ca şi în molecula reală.

Să ne referim, pentru exemplificare, la modelul mecanic al moleculei plane tetraatomice XYZ_2, în care diversele arcuri reprezintă atât forţele de legătură chimică cât şi celelalte forţe (mult mai slabe) de atracţie interatomică (forţe de câmp): fig. 1.

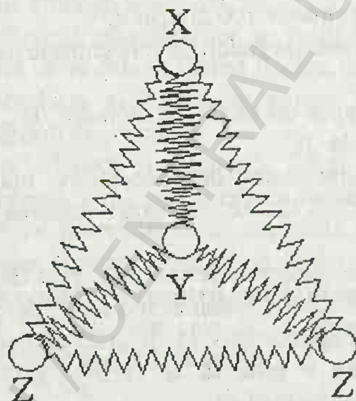
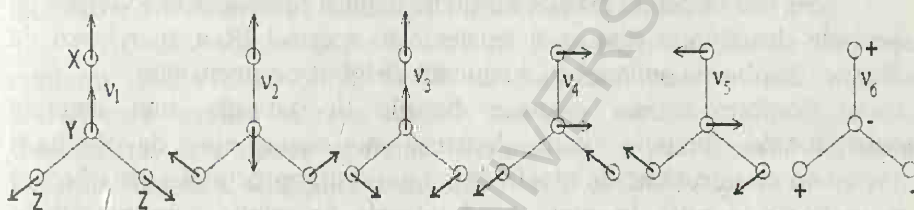


Fig. 1. Modelul mecanic al moleculei plane tetraatomice XYZ_2.

Utilizând astfel de modele s-a constatat că la orice moleculă poliatomică există anumite moduri de deplasare concomitentă a atomilor (a nucleelor) în urma cărora rezultă vibraţii ale întregii molecule, caracterizate prin faptul că fiecare atom execută o mişcare armonică liniară cu aceeaşi frecvenţă şi în aceeaşi fază cu ceilalţi atomi; amplitudinile acestor oscilaţii sunt de obicei diferite.

În timpul acestor vibrații centrul de greutate al moleculei nu își modifică poziția iar molecula în ansamblu nu se rotește în jurul centrului de greutate. Astfel de vibrații ale moleculei au fost denumite vibrații normale sau moduri normale de vibrație.

Vom ilustra mai jos modurile normale de vibrație ale moleculei XYZ_2 , așa cum au rezultat din modelul mecanic propus pentru această moleculă. Conform celor spuse mai sus dacă se deplasează cele patru nuclee după direcțiile indicate de săgeți (vezi fig. 2) și se lasă toate deodată să vibreze liber, fiecare va oscila în jurul unei poziții de echilibru cu aceeași frecvență ca și celelalte trei, în așa fel încât după fiecare perioadă de oscilație nucleele vor ocupa pozițiile inițiale.



+: iese din planul figurii, -: intră în planul figurii.
Fig. 2. Vibrațiile normale ale moleculei XYZ_2.

Numărul vibrațiilor normale corespunde numărului de grade de libertate de vibrație ale moleculei. Pentru o moleculă neliniară cu N atomi există 3N-6 grade de libertate de vibrație și tot atâtea moduri de vibrație (3 grade de libertate corespund mișcării de translație și 3 celei de rotație). Astfel pentru molecula XYZ_2 numărul de moduri de vibrație este: $3\cdot4-6=6$. În cazul moleculelor liniare numărul gradelor de libertate de vibrație (deci și al modurilor normale de vibrație) este 3N-5, deoarece rotația în jurul axei internucleare nu modifică nici una din coordonatele atomilor, astfel că există numai două grade de libertate de rotație.

Aceste moduri diferite de vibrație pot fi puse în evidență experimental iluminând modelul mecanic, pus să vibreze, cu lumina emisă de un stroboscop. În cazul moleculei XYZ_2, de exemplu, se vor găsi 6 frecvențe diferite ale luminii stroboscopului pentru care bilele vor părea că stau pe loc.

Frecvențele normale de vibrație rezultă și din calcule, prin rezolvarea ecuației seculare, iar forma fiecărui mod de vibrație normală

(mărimea şi direcţia vectorilor deplasării) se pot determina prin rezolvarea sistemului de ecuaţii corespunzătoare coordonatelor normale.

Conform teoriei clasice molecula va emite sau va absorbi radiaţii electromagnetice având frecvenţe egale cu cele de vibraţie. Conform aceleaşi teorii vor fi active în IR (absorb) numai acele moduri normale de vibraţie care duc la o variaţie concomitentă a momentului de dipol electric al moleculei. Deoarece momentul de dipol electric al moleculei nu variază (nu se modifică) pentru toate vibraţiile normale, în spectrul IR de absorbţie al unei substanţe se vor putea observa (vor fi active) doar o parte din vibraţiile normale. Vibraţiile ce nu sunt active în IR s-ar putea să fie active în spectrul Raman (despre spectrele Raman vezi cap. X).

Se ştie că teoria clasică nu poate explica toate aspectele legate de spectrele de vibraţie cum ar fi existenţa în spectrul IR a unor benzi de vibraţie (de obicei continue) cu o anumită distribuţie a intensităţii.

Conform teoriei cuantice benzile de vibraţie sunt datorate tranziţiilor de vibraţie – rotaţie, deoarece unui anumit nivel de vibraţie îi corespund o succesiune de nivele de rotaţie (în timp ce molecula vibrează ea se poate şi roti). În cazul când nivelele de rotaţie corespunzătoare diverselor stări (nivele) de vibraţie sunt foarte apropiate (dese), situaţie întâlnită la moleculele poliatomice (molecule cu mulţi atomi), la tranziţia între două stări de vibraţie-rotaţie va rezulta o bandă continuă. Frecvenţa normală de vibraţie va corespunde, cu aproximaţie, maximului unei benzi de vibraţie – rotaţie (fig. 3).

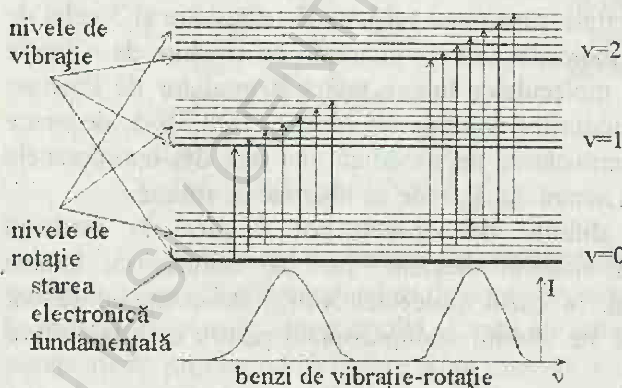


Fig. 3. Tranziţii de vibraţie-rotaţie (între nivelele de rotaţie a două stări de vibraţie) care determină apariţia benzilor de vibraţie-rotaţie.

Se poate concluziona (precum arată experienţa) că în spectrul IR

al oricărei molecule există o serie de benzi fundamentale (datorate tranziţiilor de vibraţie – rotaţie), ale căror frecvenţe sunt egale, cu unele restricţii, cu frecvenţele normale de vibraţie. De obicei aceste benzi sunt continue şi doar în puţine cazuri se evidenţiază şi structura lor de rotaţie.

Prin compararea spectrelor IR ale unui număr mare de compuşi organici s-a observat că prezenţa anumitor tipuri de legături (de exemplu =O – H, ≡N – H, ≡C – H, C = C etc.) în molecule diferite poate fi corelată cu apariţia constantă a unor benzi de absorbţie în IR, ale căror poziţie se modifică foarte puţin (dar totuşi se modifică) de la un compus la altul. S-ar putea presupune deci că grupa de atomi considerată vibrează independent (cu o frecvenţă proprie). Acest fel de frecvenţe sunt cunoscute sub denumirea generală de frecvenţe caracteristice de grup.

Această noţiune pare să vină în contradicţie cu datele teoretice conform cărora o absorbţie în IR se datorează unei vibraţii normale active, care implică vibraţia tuturor atomilor (nucleelor) din moleculă. Contradicţia este numai aparentă. Pentru a clarifica lucrurile să luăm exemplul simplu al vibraţiilor moleculelor HCN şi ClCN (fig. 4).

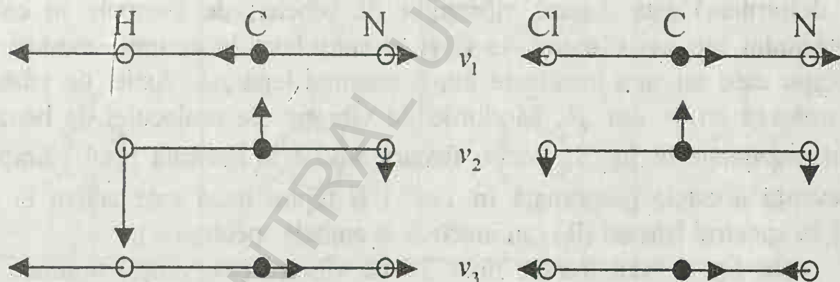


Fig. 4. Modurile de vibraţie, din planul figurii, ale moleculelor HCN şi ClCN.

Direcţia şi mărimea vectorilor mişcării, pentru o frecvenţă dată, sunt determinate de masa atomilor, de constanta de forţă şi de unghiurile dintre legături. Atomii cei mai uşori vor avea amplitudinile cele mai mari. Astfel modul ν_3 pentru HCN se caracterizează prin vibraţia aproape exclusivă a atomului H faţă de grupa CN, practic imobilă. Frecvenţa unei vibraţii de acest fel se poate calcula, cu aproximaţie, cu formula: $\nu = \frac{1}{2\pi}\sqrt{\frac{k}{\mu}}$, deoarece este caracterizată de prezenţa unei singure forţe

elastice (k = constanta forței elastice, μ = masa redusă a sistemului). Modul ν_3 constituie un exemplu tipic de frecvență caracteristică de grup. Este de așteptat ca în orice compus care conține grupa H – C să existe un mod normal de vibrație caracterizat prin oscilația atomului de hidrogen legat, prin atomul de carbon, de restul moleculei.

Se poate deci considera că vibrația normală ν_3 este localizată pe legătura H – C. La fel se întâmplă și în cazul vibrației ν_1 a moleculei ClCN, unde localizarea vibrației este pe legătura CN.

Vibrațiile ν_1 și ν_3 poartă denumirea de vibrații de valență deoarece oscilațiile au loc numai de-a lungul liniilor de valență. Acest tip de vibrații se notează prescurtat cu litera ν alături de grupa la care se referă: ν_{CH}, ν_{CN}.

Vibrațiile ν_2 pentru ambele molecule, HCN și ClCN, se fac prin modificarea unghiului dintre liniile de valență - ele se numesc de deformare și se notează cu δ : δ_{CH}, δ_{CN}.

Un alt tip de frecvențe caracteristice (pe lângă cele de valență și de deformare) este datorat vibrațiilor de schelet; de exemplu în cazul benzenului toți cei 6 atomi de C și H contribuie la anumite moduri de vibrație care nu sunt localizate într-o anumită legătură. Astfel de vibrații se notează cu γ sau β. Modurile de vibrație ale moleculei de benzen sunt prezentate în fig. 5. Pentru fiecare mod este indicată tipul vibrației, frecvența acesteia (exprimată în cm^{-1}) și faptul dacă este activă în IR (R), în spectrul Raman (R) sau inactivă în ambele spectre (ia).

În fig. 5 sunt trecute doar 20 de vibrații (frecvențe) normale cu toate că molecula de benzen are: $3 \cdot 12 - 5 = 31$ de astfel de vibrații. Aceasta din cauză că unele din acestea sunt degenerate (au aceeași frecvență) și s-a trecut, cum se obișnuiește, doar una din componentele vibrației degenerate.

Fig. 5. Modurile de vibrație ale moleculei de benzen.

În spectrele IR ale diverșilor compuși mai apar, pe lângă frecvențele (benzile) corespunzătoare vibrațiilor normale, numite și frecvențe fundamentale, și alte frecvențe (benzi) și anume:

- armonice ale frecvențelor fundamentale:
  $2\upsilon_i, 3\upsilon_i, ..., 2\upsilon_k, 3\upsilon_k, ..., 2\upsilon_l, 3\upsilon_l, ...$
- combinații de frecvențe:
  $2\upsilon_i + \upsilon_k, 2\upsilon_k - \upsilon_i, \upsilon_k + \upsilon_l - \upsilon_i, ...$
- rezonanțe.

În general intensitatea benzilor armonice şi de combinație este mult mai mică decât a benzilor fundamentale. Rezonanțele pot avea însă o intensitate mult mai mare decât a primelor.

Explicarea apariției rezonanțelor este următoarea: uneori este posibil ca într-o moleculă poliatomică nivelele a două vibrații (sau combinații de vibrații) diferite să aibă energii foarte apropiate, adică să fie accidental degenerate. Dacă vibrațiile respective sunt de aceeaşi specie poate avea loc o perturbare reciprocă a celor două nivele astfel încât unul din ele să se deplaseze spre energii mai mari, iar celălalt spre energii mai mici. Acest fenomen poate fi însoțit şi de o intensificare importantă a noilor benzi care apar.

Pe baza celor de mai sus se poate concluziona că spectrul IR al unui anumit compus (pur) este destul de dificil de interpretat. Ca exemplu, în fig. 6 se prezintă spectrul IR de absorbție al benzenului, unde se observă că pe lângă benzile (frecvențele) fundamentale mai apar şi alte benzi:

Benzile intense de la 3045 şi 3099 cm^{-1}, de exemplu, constituie un dublet de rezonanță a vibrației fundamentale υ_{20} $\left(\upsilon_{CH} = 3080\, cm^{-1}\right)$ cu combinația $\upsilon_8 + \upsilon_{19}$.

Existența frecvențelor caracteristice de grup constituie baza utilizării spectrelor de vibrație în scopul analizei structurale (adică pentru determinarea structurii moleculei) şi pentru analiza spectrală în înțelesul îngust al cuvântului, adică pentru determinarea compoziției amestecurilor.

Aparatele uzuale pentru absorbția moleculară în IR permit înregistrarea spectrelor în intervalul spectral 400-5000 cm^{-1}. Pentru acest interval există numeroase tabele, monografii şi atlase de spectre în care se pot găsi frecvențele caracteristice ale diverselor grupări din molecule şi se poate vedea cum variază ele în funcție de restul moleculei (variații mici, evident, ele putând atinge totuşi câteva sute de cm^{-1}).

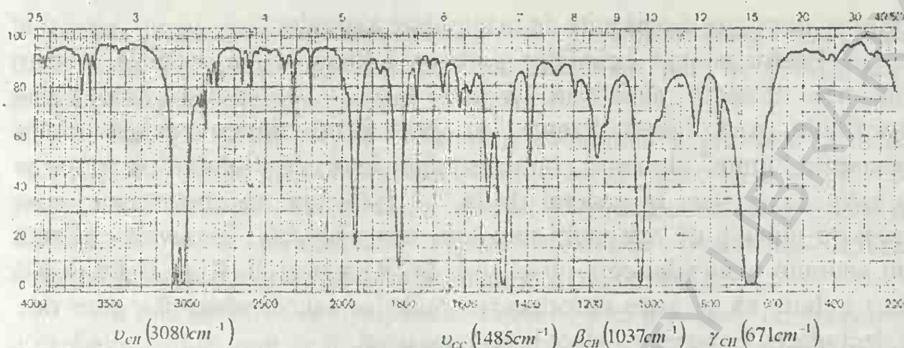


Fig. 6. Spectrul IR de absorbție al benzenului cu precizarea frecvențelor fundamentale.

VIII.2. Prepararea probelor. Alegerea solvenților.

La prepararea probelor trebuie să se țină seama de următoarele principii generale:

- Orice substanță poate fi studiată în IR, cel puțin în una din cele trei stări de agregare. În general cantitatea de probă necesară este foarte mică. De cele mai multe ori substanța poate fi recuperată.
- Starea fizică ideală a probei de analizat este cea gazoasă. În majoritatea cazurilor, însă, substanțele organice nu pot fi aduse în această stare.
- Starea lichidă este practic cea mai adecvată pentru analiza în IR. Lichidele pure sau substanțele dizolvate în solvenți potriviți pot fi manipulate cu ușurință iar rezultatele obținute sunt reproductibile. Datorită faptului că lichidele pure absorb în general foarte intens se preferă analiza lor în soluție. La interpretarea rezultatelor trebuie să se țină seama întotdeauna de efectele dizolvantului (solventului) asupra poziției (frecvenței), formei și intensității benzilor de absorbție.
- Substanțele se analizează în stare solidă numai dacă nu pot fi aduse în soluție, sau pentru a obține informații suplimentare în legătură cu structura moleculară.

Pentru analiza gazelor se utilizează în mod obișnuit cuve cilindrice având o lungime de 50-100 mm. Pentru umplerea cuvelor se

folosesc dispozitive obişnuite de manipulare a gazelor.

Pentru analiza lichidelor pure se folosesc cuve speciale în care grosimea stratului absorbant variază între 0,01 şi 0,1 mm. Dacă absorbţiile sunt foarte intense se pot folosi filme capilare –între geamurile "lipite" ale cuvei, fără distanţier între ele. Soluţiile se introduc în cuve cu grosimi în general de la 0,1 la 1 mm. În unele cazuri sunt necesare grosimi de mai mulţi mm sau mai mulţi cm. În cuvele realizate din anumite materiale (care nu absorb în IR cum ar fi: KBr, CsBr, NaCl etc.) trebuie să se evite introducerea probelor sau dizolvanţilor care duc la degradarea ferestrelor - alcooli, apă sau acizi.

Analiza substanţelor solide se face de obicei când acestea sunt aduse sub formă de pulbere fină, deoarece este greu de obţinut un strat foarte subţire şi omogen din substanţa solidă, astfel încât să se înregistreze transmisii între 30 şi 60% (valori recomandate pentru înregistrarea optimă a spectrelor IR).

Conform teoriei difracţiei, dacă se trece de la o substanţă aflată în strat omogen la pulbere, scăderea transmisiei depinde de produsul (n-1)r, în care n este indicele de refracţie relativ al particulelor în raport cu mediul în care se află aceasta, iar r – raza particulei. Scăderea transmisiei este mai accentuată spre lungimi de undă mai mici (unde n este mai mare). Acest efect se micşorează dacă pulberea este încorporată într-un mediu cu indicele de refracţie cât mai apropiat de al substanţei respective şi dacă r este foarte mică.

Cele mai răspândite tehnici de încorporare a pulberilor sunt: suspensia în nujol (denumirea obişnuită a uleiului de parafină farmaceutic) şi pastilarea în bromură de potasiu. Acest lucru se face după o pulverizare foarte fină în mojare de agat, în vibratoare electromagnetice sau prin alte metode. Tehnica încorporării probei într-o pastilă de bromură de potasiu este următoarea: substanţa de analizat, fin pulverizată, se aduce în celula unui vibrator împreună cu bromura de potasiu, pulverizată şi uscată în prealabil (proporţia este de 1 mg substanţă la cca. 300-500 mg KBr). După câteva minute de amestecare pulberea se introduce într-o matriţă din oţel inoxidabil şi se presează cu o forţă de 10^5-12.10^5 N/cm^2 timp de câteva minute. Înainte şi în timpul aplicării presiunii se evacuează aerul din matriţă pentru a evita apariţia fisurilor datorate "exploziilor" aerului comprimat între particule, după

încetarea presiunii. Pastilele trebuie să fie transparente sau puțin translucide. Compensația se face cu o pastilă de bromură de potasiu pură (adică ea se pune în locul cuvei cu solventul).

Trebuie atrasă atenția că analiza cantitativă a probelor pastilate este posibilă numai cu condiția unei standardizări riguroase a tehnicii de preparare. Precauțiile se referă în special la reproductibilitate deoarece fenomenele care influențează reproductibilitatea (reflexiile, difuzia radiațiilor, variațiile grosimii de strat) sunt greu de controlat.

În afara tehnicilor menționate există și alte procedee de preparare a probelor solide cum ar fi: obținerea unor filme solide din soluții sau din topitură, prin presarea materialului sau trecerea prin valț, secționarea la microtom etc.

Să vedem, în continuare, ce condiții trebuie să le îndeplinească solventul, în cazul utilizării soluțiilor substanțelor. Un solvent bun pentru IR trebuie să aibă benzi de absorbție cât mai puține și de intensitate mică și să prezinte interacțiuni minime cu substanța dizolvată. Ultima cerință o îndeplinesc solvenții nepolari și anume cei ce au molecula cât mai simetrică și nepolarizată. Toate aceste condiții le satisfac cu aproximație sulfura de carbon și tetraclorura de carbon. Cu acești solvenți se pot efectua, în bune condiții, înregistrări în aproape tot domeniul spectral în care se fac determinările curente (400-5000 cm^{-1}). Regiunea îngustă în care acești solvenți absorb intens (1400-1600 cm^{-1}) poate fi acoperită de tetracloretilenă.

Insolubilitatea sau solubilitatea insuficientă a multor substanțe în solvenții menționați limitează folosirea acestora. În aceste condiții este necesar să se recurgă la solvenți polari – de exemplu cloroformul. Pentru a se obține un spectru complet se utilizează uneori mai mulți solvenți, fiecare din aceștia având transmisii satisfăcătoare în regiuni unde ceilalți absorb intens.

Practica a arătat că nu există un solvent perfect inert. Vibrațiile moleculelor, cu excepția vibrațiilor de schelet și ale legăturilor nepolare, sunt influențate mai mult sau mai puțin de natura solventului. În general într-un solvent benzile corespunzătoare vibrațiilor de valență sunt deplasate spre frecvențe mai mici iar cele corespunzătoare vibrațiilor de deformare sunt deplasate spre frecvențe mai înalte, față de situația din starea de vapori a substanței (când moleculele acesteia sunt libere). De

obicei au loc şi modificări ale intensităţii şi lărgimii benzilor de absorbţie.

S-au elaborat o serie de teorii care încearcă să lege aceste modificări de natura solventului, mai exact de caracteristicile sale macroscopice – constanta dielectrică (ε) şi indicele de refracţie (n). Relaţiile obţinute pentru modificările intensităţii şi lărgimii benzilor sunt foarte complicate – nu le mai dăm aici.

Mai simple sunt relaţiile obţinute pentru modificările frecvenţelor. O relaţie des utilizată este cea a lui Buckingham:

$$(1)\quad \frac{\Delta\nu}{\nu}=\frac{\nu_{vap}-\nu_{sol}}{\nu_{vap}}=C_1+\frac{1}{2}C_2\left(\frac{\varepsilon-1}{2\varepsilon+1}\right)+\frac{1}{2}C_3\left(\frac{\varepsilon-1}{2\varepsilon+1}\right)=f(\varepsilon),$$

aplicabilă solvenţilor nepolari, şi:

$$(2)\quad \frac{\Delta\nu}{\nu}=C_1+C_2\left(\frac{\varepsilon-1}{2\varepsilon+1}\right)+C_3\left(\frac{n^2-1}{2n^2-1}\right)=f(\varepsilon,n),$$

aplicabilă solvenţilor polari. Se consideră că $n=n_D$.

Constantele C sunt corelate cu parametrii moleculei de cercetat (momentul de dipol, polarizabilitatea etc.), totuşi ele nu pot fi calculate, intervenind prea multe mărimi nemăsurabile, valorile lor rezultând din experienţă, cum vom vedea mai jos.

Precizăm că formulele de mai sus au fost deduse cu ajutorul mecanicii cuantice luându-se în considerare interacţiunile de tip Van der Waals dintre moleculele solventului şi ale solvitului. Acest tip de interacţiuni se mai cheamă şi universale sau de volum deoarece nu prezintă saturaţie.

Se consideră că formulele se aplică în situaţia când există o dependenţă liniară între $\frac{\Delta\nu}{\nu}$ şi funcţia f(ε) sau f(ε,n), bineînţeles în cazul moleculelor solvitului de un anumit tip (pentru o anumită substanţă) şi pentru o anumită frecvenţă de vibraţie.

Constantele C_2 şi C_3 îndeplinesc rolul de constante de liniarizare, valorile acestora alegându-se în aşa fel încât să rezulte o dependenţă liniară între $\frac{\Delta\nu}{\nu}$ şi f(ε) sau f(ε,n).

În fig. 8 se prezintă două situaţii fictive de aplicare a formulelor (1) şi (2), situaţii care se pot întâlni şi în cazurile reale. Cifrele arabe corespund diverşilor solvenţi (ipotetici).

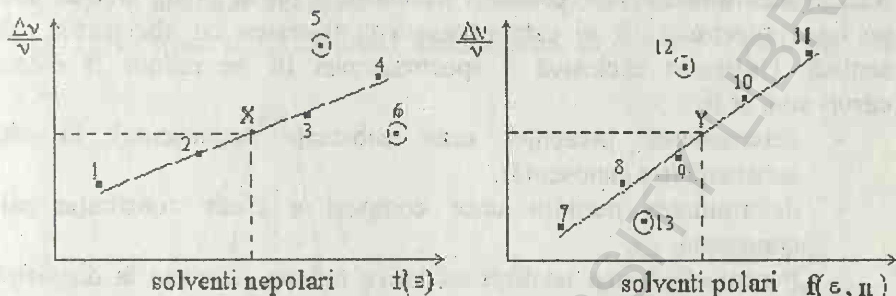


Fig. 8. Forma tipică a dependenţelor date de formulele (1) şi (2).

Aceste grafice pot fi utilizate pentru determinarea lui $\frac{\Delta\nu}{\nu}$ în cazul unor solvenţi oarecare X şi Y (solvenţi folosiţi la obţinerea spectrului IR) alţii decât ce utilizaţi pentru trasarea graficelor. Astfel de determinări sunt foarte importante în analiza calitativă (analiză ce se face pe baza frecvenţelor caracteristice de grup) în situaţia când spectrul probei de cercetat este realizat într-un anumit solvent iar spectrele de comparaţie (cele din atlasele de spectre) sunt obţinute fie cu un alt solvent fie pentru starea de vapori.

Deci, pentru fiecare substanţă avută în vedere în cazul analizelor trebuie trasate grafice ca mai sus, bineînţeles pentru cât mai multe frecvenţe caracteristice de grup.

În unele cazuri (în special în cazul legăturilor X – H, X=C, S, N etc.) între moleculele de solvit şi cele de solvent pot apărea şi interacţiuni specifice prin intermediul unor forţe ce prezintă saturaţie şi care generează compuşi moleculari instabili (interacţiuni de tip legătură de hidrogen sau prin transfer de sarcină). Aceste interacţiuni determină abateri de la formula Buckingam, respectiv de la dreptele reprezentate mai sus – este cazul solvenţilor (ipotetici) încercuiţi. Pentru a ţine seama şi de aceste interacţiuni formulelor de mai sus li se mai adaugă un termen de corecţie astfel încât dreapta să "cuprindă" şi aceşti solvenţi.

VIII.3. Analiza calitativă şi cantitativă utilizând spectrele IR.

Conform celor spuse în VIII.1 (vezi şi problema practică din VIII.5) identificarea unor compuşi necunoscuţi nu se poate efectua doar pe baza spectrelor IR ci este necesară conlucrarea cu alte metode de analiză. Utilizarea exclusivă a spectroscopiei IR se reduce la câteva cazuri cum ar fi:

- determinarea prezenţei unei substanţe (cunoscute) în altă substanţă (tot cunoscută),
- determinarea purităţii unor compuşi a căror constituţie este cunoscută.

Pentru efectuarea analizei calitative trebuie să avem la dispoziţie spectrele componentelor în stare pură. În acest scop se apelează la cataloagele de spectre. Este de dorit ca aceste spectre să fie obţinute cu acelaşi aparat şi în aceleaşi condiţii experimentale ca şi ale compusului bănuit. Cum acest lucru nu este întotdeauna posibil, după ce s-a stabilit asemănarea dintre spectrul substanţei bănuite cu cel al substanţei cunoscute, este necesar să se obţină în laborator spectrul acesteia în aceleaşi condiţii, pentru a se evita diferenţele de putere de rezoluţie, de etalonare în numere de undă (sau în lungimi de undă), de grosimea probei.

La baza analizei cantitative stă legea lui Lambert – Beer, scrisă sub forma:

(3) $$I^{\nu} = I_0^{\nu} 10^{-\varepsilon_\nu cl} \qquad \text{sau} \qquad \log\frac{I_0^{\nu}}{I^{\nu}} = E^{\nu} = \varepsilon_\nu cl,$$

unde c este concentraţia substanţei, exprimată de obicei în moli/litru(M/l) iar l – grosimea stratului absorbant, exprimată de obicei în cm. Coeficientul ε_ν poartă denumirea de coeficient molar de extincţie, el măsurându-se în l/M.cm.

După cum s-a mai spus, drept frecvenţă de vibraţie (ν) se ia frecvenţa maximului unei benzi de absorbţie.

Trebuie să se ţină seama că în unele situaţii pot apare abateri de la legea lui Lambert – Beer. Astfel de abateri pot fi determinate, de exemplu, de lărgimea (prea mare) a fantelor monocromatorului spectrofotometrului.

Se ştie că orice monocromator are o anumită bandă de trecere, de lărgime $\Delta\nu$, lărgime cu atât mai mare cu cât deschiderile (lărgimile) fantelor sale sunt mai mari. Astfel că, în cazul când monocromatorul este "fixat" pe o anumită frecvenţă ν, detectorul spectrometrului va înregistra drept I_0^ν (în lipsa absorbantului) toată banda de trecere - vezi fig. 9a)

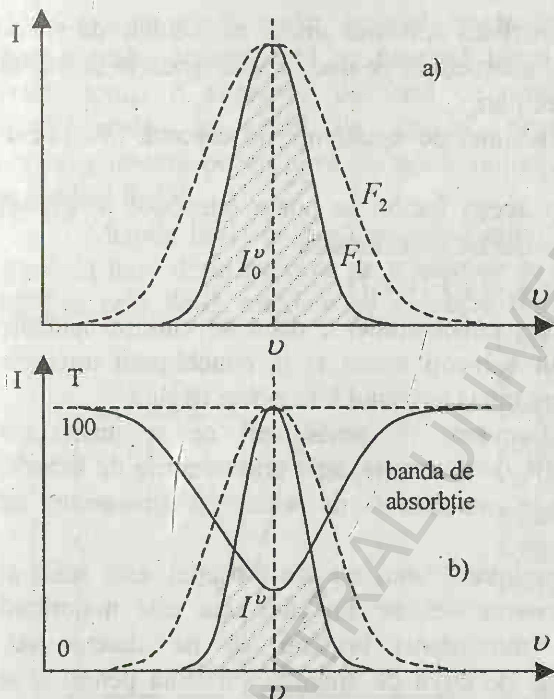


Fig. 9. Distribuţia intensităţii în „linia" de frecvenţă υ pentru două lăţimi F_1 şi F_2 ale fantei monocromatorului $(F_2 > F_1)$

a) înainte ca radiaţia să fie absorbită

b) după absorbţie.

(curba continuă reprezintă banda de trecere pentru o lărgime F_1 a fantelor iar curba punctată reprezintă banda de trecere pentru o lărgime $F_2 > F_1$ a fantelor).

Asemănător se întâmplă şi în cazul când fasciculul de radiaţii ce iese din monocromator trece prin stratul absorbant şi când drept I^ν se înregistrează toată banda haşurată, aşa cum rezultă din fig. 9b).

În aceste condiţii, cu cât fantele monocromatorului sunt mai largi, cu atât raportul $\frac{I_o^\nu}{I^\nu}$ va scădea deci şi extincţia E^ν va scădea, ceea ce face să nu se mai respecte legea Lambert – Beer.

Abateri de la legea Lambert – Beer mai pot apărea în următoarele situaţii:

- în urma asocierii moleculelor substanţei solvite (lucru ce se întâmplă la concentraţii mari ale acesteia) când, datorită formării unor complecşi moleculari, se modifică frecvenţa de vibraţie ν,
- în urma unor interacţiuni specifice dintre moleculele de solvit şi cele de solvent, interacţiuni ce duc de asemenea la formarea de complecşi moleculari,
- în urma difuziei radiaţiei pe eşantionul de cercetat (în special în cazul pulberilor).

Ţinând seama de toţi aceşti factori se poate introduce în (3) un termen de corecţie F(ν, c, l), astfel că se poate scrie :

(4) $$E^{\nu} = \varepsilon_{\nu} cl + F(\nu, c, l),$$

relaţie ce permite determinarea concentraţiei c dacă se cunosc celelalte mărimi. În cazul soluţiilor în solvenţi neutri şi la concentraţii mici ale substanţei solvite (dar nu foarte mici) termenul F se poate neglija.

Situaţiile cele mai frecvente de amestecuri ce se analizează cantitativ utilizând spectrele IR de absorbţie, sunt amestecurile de lichide, impurităţi dizolvate în lichide, amestecuri de solide şi amestecuri de gaze.

Cel mai simplu caz, pe care îl vom supune discuţiei, este acela al amestecului de două componente lichide din care una este majoritară (peste 90%) iar cealaltă (minoritară) urmând să fie determinată. Presupunem că nu se dispune de cuvă de grosime variabilă pentru a se putea compensa absorbţia datorată componentei majoritare. În această situaţie se face doar compensarea absorbţiei produse de geamurile cuvei de măsură cu ajutorul unei cuve identice goale sau mai bine, pentru a evita pierderile de lumină prin reflexie, cu ajutorul unei plăci din materialul ferestrelor, având grosimea egală cu cea a ferestrelor.

Se pot întâlni două situaţii. Prima ar fi aceea că fiecare din componentele amestecului prezintă una sau mai multe benzi cheie (benzi caracteristice intense utilizate pentru analiză) într-o regiune spectrală în care cealaltă componentă nu absoarbe. Concentraţia necunoscută se poate calcula direct din legea Lambert – Beer, măsurând în prealabil extincţia pentru una sau mai multe benzi cheie, ε_{ν} pentru aceste benzi luându-se

din tabele.

Mai sigur e să se traseze o curbă de etalonare pentru o serie de concentraţii cunoscute ale compusului de determinat, luând în ordonată fie transmisia fie extincţia iar pe baza acestei curbe să se determine concentraţia necunoscută.

În alte situaţii însă nu este îndeplinită condiţia ca în dreptul benzii cheie a unei componente, cealaltă componentă să nu absoarbă. Chiar dacă cealaltă componentă nu prezintă benzi specifice în acel loc poate exista totuşi o absorbţie de fond ce provine de la sateliţii benzilor fundamentale. În astfel de situaţii, pentru determinarea extincţiei corespunzătoare benzii cheie se poate utiliza fie metoda liniei de bază fie procedeul Pirlot.

Metoda liniei de bază se aplică atunci când banda de analiză este cuprinsă între două maxime de transmisie ca în fig. 10. Tangenta comună MN la cele două maxime se numeşte linie de bază. Prin punctul de intersecţie P dintre linia de bază şi ordonata punctului R, ce corespunde maximului de absorbţie (deci unde transmisia va fi minimă), se duce o linie paralelă cu axa absciselor. Extincţia E a benzii alese se calculează cu relaţia: $E = K \lg \frac{A}{B}$, unde K este o constantă iar A şi B au valorile obţinute de pe diagramă. Cu valorile lui E găsite pe baza acestei metode, pentru un şir de soluţii de diverse concentraţii ale probei de determinat, se trasează curba de etalonare.

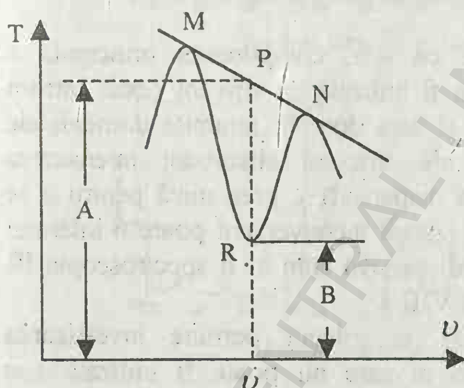


Fig. 10. Aplicarea metodei liniei de bază.

Procedeul Pirlot se aplică în cazul când curba de absorbţie este prea abruptă sau când cele două maxime de transmisie adiacente minimului sunt prea puţin pregnante (fig. 11).

De o parte şi de alta a frecvenţei ν a maximului de absorbţie se iau, la distanţe arbitrare, două frecvenţe υ_1 şi υ_2. Dreapta dusă prin

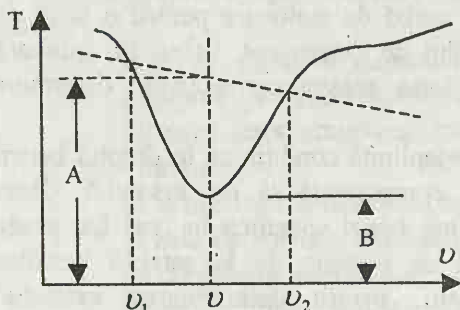


Fig. 11. Aplicarea procedeului Pirlot.

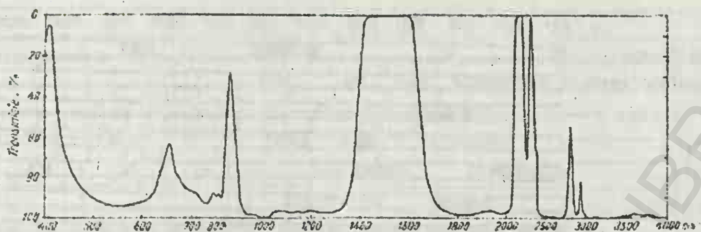
punctele de intersecţie ale ordonatelor acestor două frecvenţe cu spectrul reprezintă acum linia de bază, cu care se procedează ca şi în cazul precedent.

Metoda liniei de bază se foloseşte şi în cazul analizei amestecurilor formate din mai multe componente lichide sau solide. Pentru ultimele este de preferat să se găsească un solvent potrivit încât să se recurgă la analiza soluţiilor.

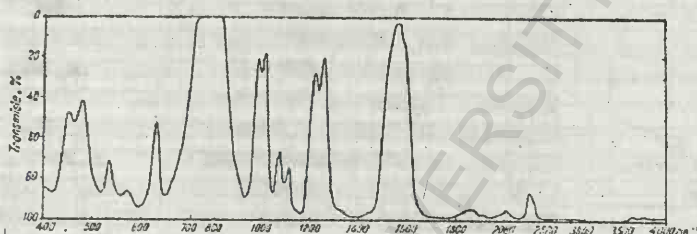
În fig. 12 se prezintă spectrele IR ale celor mai utilizaţi solvenţi, iar în fig. 13 sunt redate schematic zonele în care pot fi utilizaţi câţiva dintre solvenţii folosiţi în infraroşu.

Din figura 13 se observă că apa, componenta principală a diverselor medii biologice, nu poate fi utilizată ca solvent decât într-un strat foarte subţire (sub 0,01 mm) şi asta doar în anumite domenii ale spectrului. La astfel de grosimi ale stratului absorbant intensitatea semnalului obţinut, utilizând metoda dispersivă, e prea mică pentru a se putea obţine un spectru interpretabil. Acest inconvenient poate fi înlăturat însă dacă se utilizează o metodă nedispersivă cum ar fi spectroscopia IR cu transformată Fourier (FTIR) - vezi VIII.3.

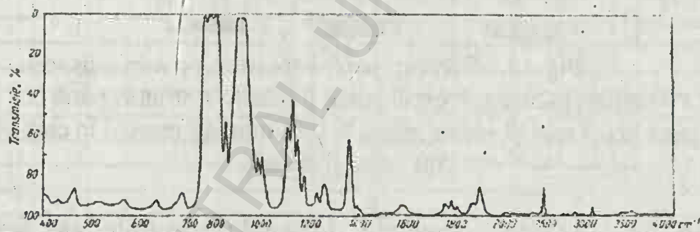
Utilizarea apei grele (D_2O) ca solvent permite investigarea benzilor de absorbţie în domeniile in care nu poate fi utilizată apa obişnuită.Ca exemplu ar fi domeniul spectral 1500-1800 cm^{-1} unde sunt prezente benzile de valenţă (de alungire) ale grupelor C=O, C=N, C=Ç şi -CO-NH-, grupe comune multor tipuri de biomolecule cum ar fi nucleotidele, acizii nucleici, proteinele etc.



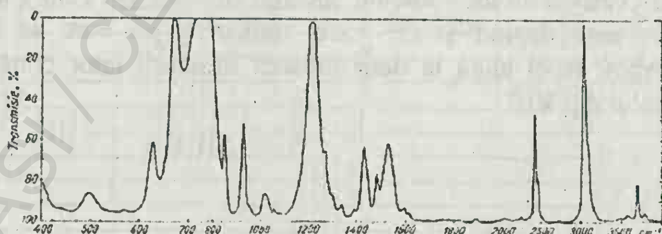
Spectrul infraroşu al sulfurii de carbon (grosimea stratului $l = 0{,}63$ mm)



Spectrul infraroşu al tetraclorurii de carbon ($l = 0{,}63$ mm).



Spectrul infraroşu al tetraclor-etilenei ($l = 0{,}11$ mm).



Spectrul infraroşu al cloroformului ($l = 0{,}11$ mm).

Fig. 12. Spectrele infraroşii ale celor mai utilizaţi solvenţi.

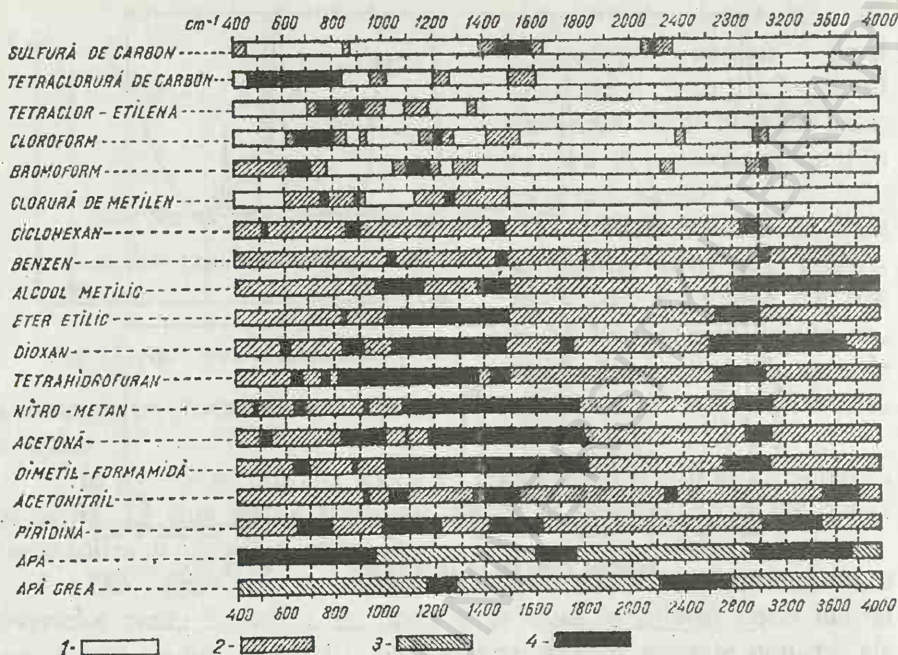


Fig. 13. Solvenţi pentru spectroscopia în infraroşu.
1 - regiuni în care solventul poate fi folosit în straturi până la 1 mm; 2 - idem, până la 0,1 mm; 3 - idem, până la 0,01 mm; 4 - regiuni în care solventul nu poate fi folosit.

În fig. 14 sunt prezentate domeniile spectrale ale frecvenţelor caracteristice de grup corespunzătoare diverşilor radicali organici şi anorganici (vorbim de un domeniu spectral fiindcă, aşa cum s-a mai spus, aceste frecvenţe depind şi de restul moleculei cu care se leagă acel radical). Acest tabel ajută la determinarea structurii unor compuşi puri - vezi exemplul din VIII.

4000 cm⁻¹ 3500 3000 2500 2000 1800 1600 1400 1200 1000 800 600 400

GRUPURI ALCANE

CH_3-C METIL
$CH_3-(C=O)$
$-CH_2-$ METILEN
$-CH_2-(C=O)-(CH_2-C\equiv N)$
$\ni CH$
ETIL
N-PROPIL
IZO-PROPIL
TERT BUTIL

-CH—CH—CH—CH

ALCHENE

NE-CH=CH
$H_2C=CH$ (TRANS)
(CIS)
(CONJ)

ALCHINE

$-C\equiv C-H$
$\equiv CH$

AROMATICE

MONO SUBST BENZEN
ORTO DISUBST
META
PARA
TRISUBST ASIMETRIC
SIMETRIC
α NAFTALINE
β NAFTALINE
(CLARI)

ETERI

ETERI ALIFATICI CH_2-O-CH_2
ETERI AROMATICI $\phi-O-CH_2$
(in HARE)

ALCOOLI

(LIBERI) (CLARI)
(LEGATI) BANDA LARGA)
ALCOOLI PRIMARI CH_2-OH
SECUNDARI $CH-OH$
TERTIARI $C-OH$
AROMATICI $\phi-OH$
(in HARE)

ACIZI

(BANDA LARGA)
ACIZI CARBOXILICI COOH
CARBOXIL IONIZAT SARURI (OH) AMFOTERI ETC. $C-C(=O)$
BANDA LARGA — (Absent in monomer)

ESTERI

FORMATI $H-CO-O-R$
ACETATI $-CH_2-CO-O-R$
PROPIONATI $-CH_2-CO-O-R$
BUTIRATI SI $-CH_2-CO-O-R$
ACRILATI $-CH-CO-O-R$
FUMARATI $-CH-CO-O-R$
MALATI $-CH-CO-O-R$
BENZOATI, FTALATI $\phi-CO-O-R$

ALDEHIDE

ALDEHIDE ALIF $-CH_2-CHO$
ALDEHIDE AROM $\phi-CHO$

CETONE

CETONE ALIF $CH_2-CO-CH_2$
CETONE AROM $\phi-CO-C$

ANHIDRIDE

ANHIDRIDE NORMALE $C-CO-O-CO-C$
ANHIDRIDE CICLICE $O=C-O-C=O$, $C-C$

AMIDE

BANDA LARGA
AMIDA $-CO-NH_2$
AMIDA MONO SUBST $-CO-NH-R$
AMIDA DI SUBST $-CO-NR_2$

AMINE

AMINE PRIMARE
$CH-NH_2$
$CH-NH_2$
$\phi-NH_2$
(BANDA LARGA) AMINE LICHIDE)

4000 cm⁻¹ 3500 3000 2500 2000 1800 1600 1400 1200 1000 800 600 400

2.50 μm 2.75 3.00 3.25 3.50 3.75 4.00 4.5 5.0 5.5 6.0 6.5 7.0 7.5 8.0 9.0 10 11 12 13 14 15 20 25

Fig. 14. Caracteristicile frecvenţelor de grup din domeniul infraroşu. Benzile suprapuse sunt marcate 2υ. T=benzi tari, M=benzi de tărie medie;

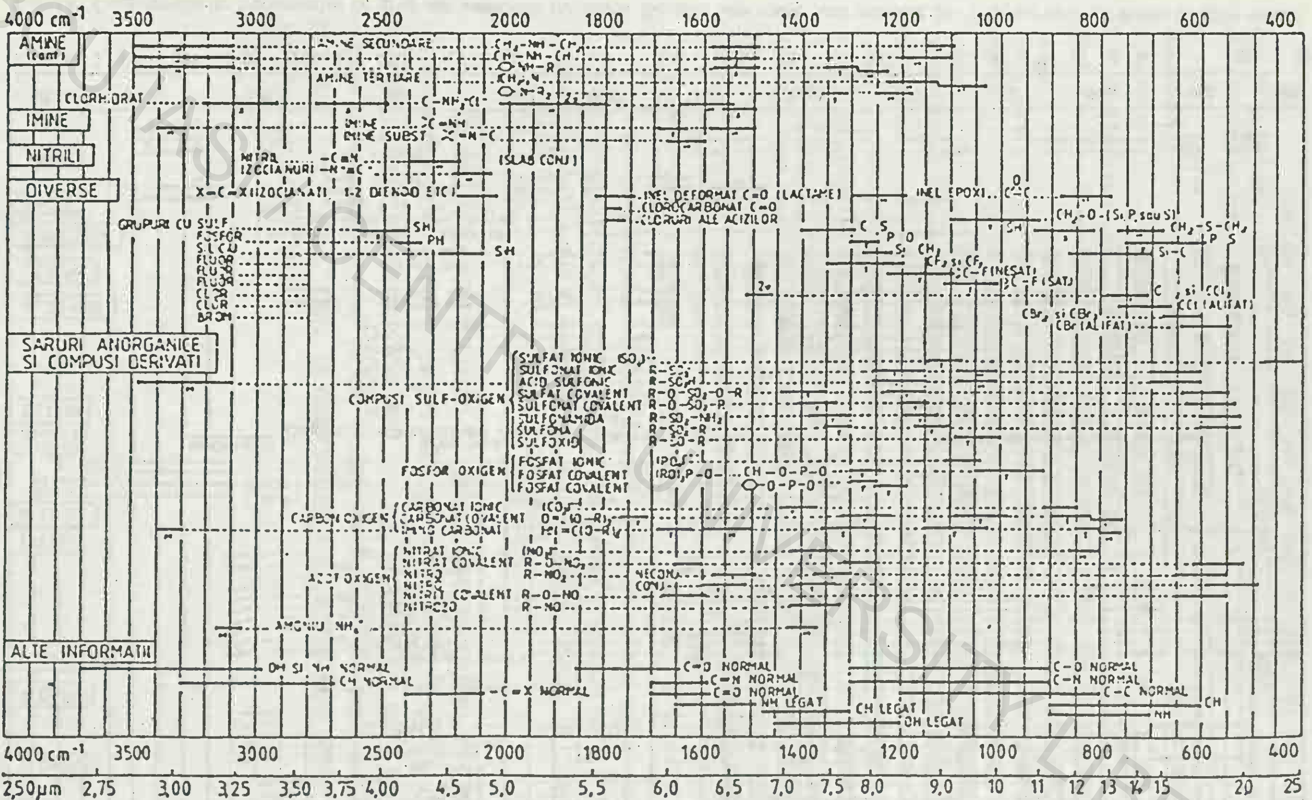


Fig. 14. continuare: Caracteristicile frecvențelor de grup din domeniul infraroșu. Benzile suprapuse sunt marcate 2υ; T=benzi tari; M=benzi de tărie medie; S=benzi slabe.

Pentru identificări rapide se poate recurge mai întâi la o listă de control ca aceea prezentată în tabelul 1.

Tabel 1. Listă de control preliminar pentru interpretarea datelor spectrale din infraroşu.

Spectrul		Indicaţii
1. Absorbţie la:	2,5-3,2 μm	Compuşi O-H, N-H
Se controlează:	a. 5,7-6,1	Acizi
	b. 5,9-6,7	Amide (uzual două benzi)
	c. 7,5-10,0	Compuşi -O-
	d. circa 15,0	Amine primare (spectru larg)
2. Absorbţie clară la:	3,2-3,33 μm	Olefine, aromatice
Se controlează:	a. 5,0-6,0	Nuclee benzenoide (slab)
	b. 5,96-6,10	Olefine
	c. 6,10-6,90	Aromatice (două benzi)
	d. 11,0-15,0	Aromatice (câteva benzi foarte tari)
3. Absorbţie clară la:	3,35-3,55 μm	Alifatice
Se controlează:	a. 6,7-7,0	$-CH_2-$, $-CH_3$
	b. 7,1-7,4	$-CH_3$
	c. 13,3-13,9	$-(CH_2)_4-$
4. Două benzi slabe la:	3,4-3,7 μm	Aldehide
Se controlează:	5,7-6,1	Aldehide şi cetone
5. Absorbţia la:	4,0-5,0 μm	Acetilene, nitrili
6. Benzi tari şi foarte clare:	5,4-5,8 μm	Esteri, halogenuri de acil (1 pic)
Se controlează:	7,5-10,0	Anhidride (2 picuri)
		Compuşi -O-
7. Benzi tari şi foarte clare la:	5,7-6,11 μm	Aldehide, cetone şi acizi
8. Benzi tari la:	7,5-10,0 μm	Compuşi -O- (Notă: se pot confunda cu benzile scheletice)
9. Benzi tari la:	11,0-15,0 μm	Aromatice, cloruri

VIII.4. Tehnica înregistrării spectrelor IR de absorbţie: metoda dispersivă.

Pentru a înţelege modul de înregistrare a spectrelor IR de absorbţie prin metoda dispersivă vom analiza schema optică simplificată a spectrofotometrului UR20, mai des întâlnit în laboratoare, un aparat cu două fascicule (fig. 7).

Sursa B de radiaţii utilizată este cunoscută sub denumirea de Globar sau Silit. Ea constă dintr-o vergea de carbură de siliciu; partea centrală, având o lungime de câţiva centimetri şi un diametru de 6-8 mm, constituie zona incandescentă, emiţătoare de radiaţii. Între capetele vergelei, care sunt îngroşate şi metalizate, se aplică o tensiune de 40 V, realizându-se un curent de 12-14 A, ceea ce duce la o încălzire a părţii centrale la circa 1600 K.

Razele de lumină ce provin de la sursa B sunt trimise spre cele două cuve K_1 (cu soluţia) şi K_2 (cu solventul) cu ajutorul oglinzilor plane $P_1 ... P_4$ şi a oglinzilor concave H_1 şi H_2.

Fasciculele de radiaţii ce ies din cuvele K_1 şi K_2 sunt focalizate cu ajutorul oglinzilor concave H_3 şi H_4 şi a oglinzilor plane P_5, P_6 şi P_8 pe discul rotitor P_7, acţionat de motoraşul M_1. O jumătate a discului funcţionează ca o oglindă (fiind argintată), cealaltă jumătate e transparentă.

Jumătatea „oglindă” a discului preia razele ce vin de la cuva K_1 şi le trimite, prin intermediul oglinzilor H_5 şi P_9 pe diafragma de apertură AB, apoi pe preselectorul V_z, iar apoi lentila L_1 le focalizează pe fanta de intrare S_E a monocromatorului.

Preselectorul de radiaţie V_z constă dintr-o oglindă plană şi două filtre de reflexie ce se interpun în drumul razelor, în funcţie de domeniul numerelor de undă pentru care se înregistrează spectrul, şi care servesc la micşorarea luminii parazite în domeniul spectral de lungimi de undă mari (numere de undă mici). Razele de lumină albă ce au intrat prin fanta S_E sunt trimise, în urma reflexiei pe oglinda plană P_{10}, pe oglinda colimator H_6 care le dirijează spre una din prismele P_r.

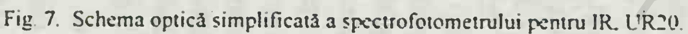


Fig. 7. Schema optică simplificată a spectrofotometrului pentru IR. UR20.

În urma traversării prismei şi a dispersiei lor, razele se reflectă de oglinda Littrow P_{11}, trec din nou prin prismă şi se reflectă apoi de oglinda concavă H_6. Cu ajutorul oglinzii P_{12}, oglinda concavă H_6 formează spectrul în planul fantei de ieşire S_A. Fasciculul aproximativ monocromatic ce iese din această fantă cade, prin intermediul oglinzii plane P_{13} şi a oglinzii plane P_{14}, pe oglinda concavă H_7. Aceasta, împreună cu lentila L_2, focalizează fasciculul pe termoelementul ThE.

Pentru a se putea înregistra absorbţia radiaţiilor de diferite lungimi de undă, produsă de substanţa din cuva K_2, pe termoelement trebuie să cadă radiaţii de diferite lungimi de undă. Pentru aceasta oglinda Littrow este rotită în jurul unui ax vertical astfel încât spectrul să defileze prin faţa fantei de ieşire a monocromatorului. O mişcare uniformă în timp ar duce la o reprezentare neliniară a numerelor de undă, din cauza faptului că dispersia prismelor nu este constantă. Pentru liniarizare, mişcarea (rotirea) oglinzii Littrow este dirijată de un disc de ghidaj KL. Aceasta constă din trei profile care sunt calculate conform variaţiei , cu lungimea de undă, a dispersiei celor trei prisme.

În timpul parcurgerii spectrului lărgimea fantelor S_E şi S_A este modificată simultan de la un disc de ghidaj în aşa fel încât, de-a lungul întregului spectru, intensitatea radiaţiilor ce urmează să fie măsurată să rămână aproximativ constantă.

Deoarece discul cu oglinda P_7 se roteşte mult mai repede decât oglinda Littrow P_{11}, pe termocuplul ThE vor cădea practic la intervale foarte scurte, radiaţii cu aceeaşi lungime de undă.; o dată radiaţii ce vin de la cuva K_1 şi altă dată radiaţii ce vin de la cuva K_2.

Termocuplul îşi măreşte şi îşi micşorează temperatura în ritmul rotirii oglinzii P_7: razele ce trec prin solvent vor da o temperatură mai mare iar cele ce trec prin soluţie o temperatură mai mică. La bornele termocuplului se obţine astfel un semnal electric pulsatoriu, proporţional cu energia radiaţiilor ce cad pe el, semnal ce este condus la dispozitivul V: un amplificator cuplat cu o serie de componente electronice de măsură şi comandă precum şi un detector de fază ce „informează" amplificatorul

de poziția în orice moment a oglinzii P_7.

Semnalele electrice, proporționale cu I și I_0 (I - intensitatea radiațiilor ce au ieșit din cuva cu soluție, I_0 - intensitatea radiațiilor ce au ieșit din cuva cu solvent) sunt măsurate printr-o metodă de zero utilizându-se un așa numit nul optic, constând dintr-o diafragmă de o formă specială, (Bl_1). În funcție de raportul celor două semnale electrice (și al raportului intensităților $\frac{I}{I_0}$) motorașul reversibil M_4, comandat de la blocul V, va modifica lărgimea diafragmei Bl_1, mișcând simultan și penița înregistratorului. Înscrierea spectrului este posibilă prin faptul că hârtia înregistratoare este deplasată de același motoraș M_5 care rotește și discul de ghidaj KL.

Mutarea (fixarea) peniței înregistratorului pe linia corespunzătoare unei transmisii $T = 100\%$, se face cu ajutorul diafragmei de corecție Bl_2, asta în cazul când în calea celor două fascicule sau nu se află nici una din cuve, sau se află cuvele goale (cuve identice).

Deoarece multe din componentele optice ale spectrofotometrului sunt realizate din substanțe higroscopice (prismele, lentilele de proiecție, ferestrele) aparatul este prevăzut cu o instalație de climatizare, cu uscarea și termostatarea aerului, care trebuie să funcționeze tot timpul.

VIII.5. Probleme practice de laborator.

VIII.5.1. Exemplu pentru determinarea structurii unui compus necunoscut (pur) utilizând spectrul IR de absorbție.

Vom analiza următoarea problema practică: „O probă necunoscută nu prezintă absorbție în domeniul ultraviolet (până la 40.000 cm^{-1}) și nici în domeniul vizibil. Spectrul său în infraroșu este prezentat în fig. 15. Ce concluzie se poate trage despre structura substanței necunoscute din aceste informații ? “

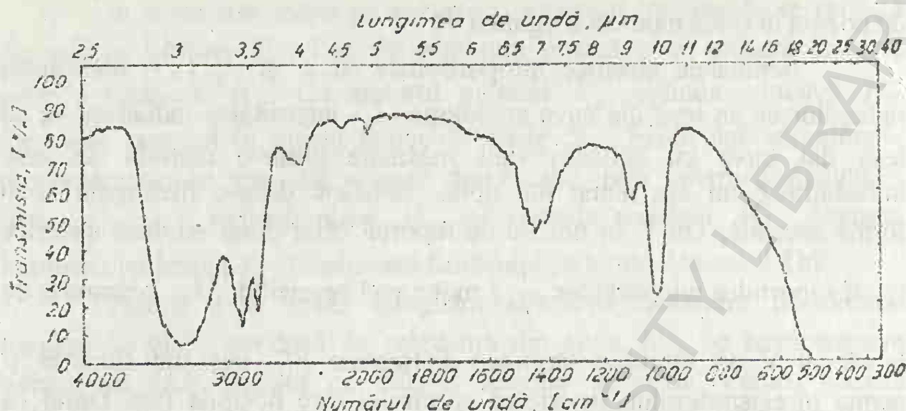


Fig. 15. Spectrul în infraroşu al compusului necunoscut.

În urma consultării listei de control preliminar prezentată în tabelul 1 (VIII.4), datele obținute s-au sintetizat în tabelul 2.

Tabelul 2. Interpretarea preliminară a spectrului din fig. 15.

Spectrul (vezi fig. 15)	Control (μm)	Indicații
1.Bandă largă la 3 μm Nu are loc absorbția Nu are loc absorbția 9,8 μm 16 μm	 5,7-6,1 5,9-6,7 7,5-10,0	OH sau NH (legătură de hidrogen) Nu este un acid Nu este o amidă Posibil -O- Posibil amină primară ($-NH_2$)
2. Nu are loc absorbția	3,2-3,33	Nu este nesaturat Nu este aromatic
3. Banda de 3,4 şi 3,55 μm Banda ~7,0 μm 7,0 μm Nu are loc absorbția	 7,1-7,4 13,3-13,9	Alifatic C-H Nu $-CH_2-$ sau CH_3 CH_3 Nu $-(CH_2)_4-$

Tabel 2, continuare.

4. Nu sunt benzi slabe la 3,4-3,7 μm Nu are loc absorbţia	5,7-6,1	Nu este aldehidă sau cetonă
5. Nu are loc absorbţia	4,0-5,0	Nu este acetilenă sau nitril
6. Nu are loc absorbţia	5,4-5,8	Nu este ester, nu are grupuri halogenate
7. Nu are loc absorbţia	5,7-6,1	Nu aldehide, cetone, acizi
8. Banda 9,8 μm		-O- alcool, eter
9. Nu are loc absorbţia	11,0-15,0	Nu aromatice, cloruri

Pe baza datelor din tabelul 2 se poate trage concluzia că specia moleculară conţine gruparea CH, probabil sub formă CH_3 şi un grup OH sau NH_2, legat printr-o legătură de hidrogen. Pentru a face diferenţa între NH şi OH, urmărind fig. 15 se observă că NH şi OH există în următoarele domenii de lungimi de undă (μm):

NH	O-H (primar)
2,6-3,3	2,6-3,3
5,7-6,3	6,8-7,3
7,7-11,4	7,4-7,8
11,4-14,5	9,5-10

Datele de mai sus ne arată că spectrul obţinut se potriveşte mai mult cu cel al unui alcool primar decât cu cel al unei amine primare. Se poate trage concluzia că molecula aparţine unui alcool primar saturat.

Din păcate, datele de mai sus nu sunt suficiente pentru stabilirea structurii exacte a moleculei, fiind necesare o serie de date adiţionale. Se poate recurge la următoarele date relative la compusul necunoscut:

- masa moleculară: 33,03
- punctul de fierbere: $64,7^0C$
- starea fizică: lichid clar la temperatura camerei
- analiza chimică a elementelor:

C=37,5%
H=12,6%
O=49,9%
100%

- formula empirică: CH_4O.

Din aceste date adiţionale reiese că molecula studiată este o moléculă de metanol.

Obs. În cazul spectrofotometrelor pentru IR moderne „căutările" ca cele de mai sus sunt efectuate de calculatorul anexat aparatului, în memoria căruia sunt introduse, sau mai pot fi introduse, datele necesare identificării structurii compuşilor chimici.

VIII.5.2. Determinarea concentraţiei de alcool etilic (ca „impuritate") din tetraclorura de carbon.

În spectrele de infraroşii, din domeniul 3100-3800cm^{-1}, ale soluţiilor diluate de alcool etilic în tetraclorura de carbon (de concentraţii sub 1M/l), apare atât banda υ_{OH} corespunzătoare monomerului cât şi banda υ_{OH} corespunzătoare legării mai multor molecule de alcool prin legături de hidrogen (fig. 16; spectrul a fost înregistrat luându-se în ordonată extincţia E). Curba punctată corespunde alcoolului pur.

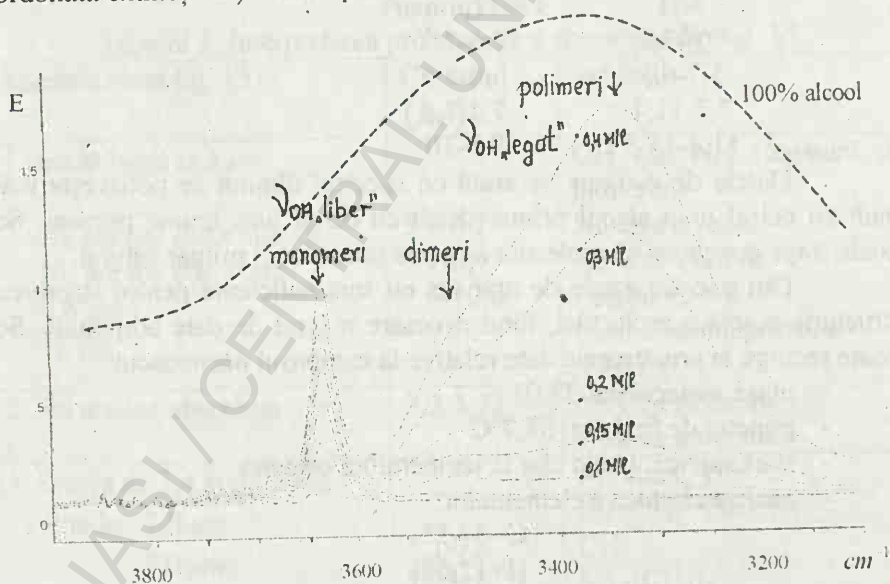


Fig. 16. Spectrele infraroşii, din domeniul 3100-3800cm^{-1}, al soluţiilor de alcool etilic în CCl_4. Pe curbe s-a trecut concentraţia alcoolului.

În fig. 17 se prezintă variația intensității celor două benzi în funcție de concentrați alcoolului: a) în cazul monomerului, b) în cazul

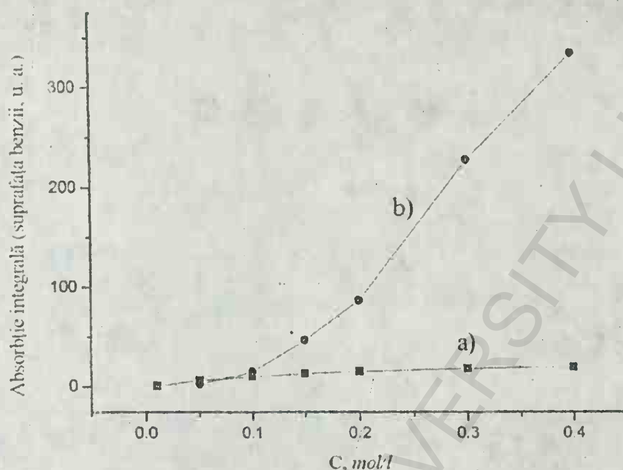


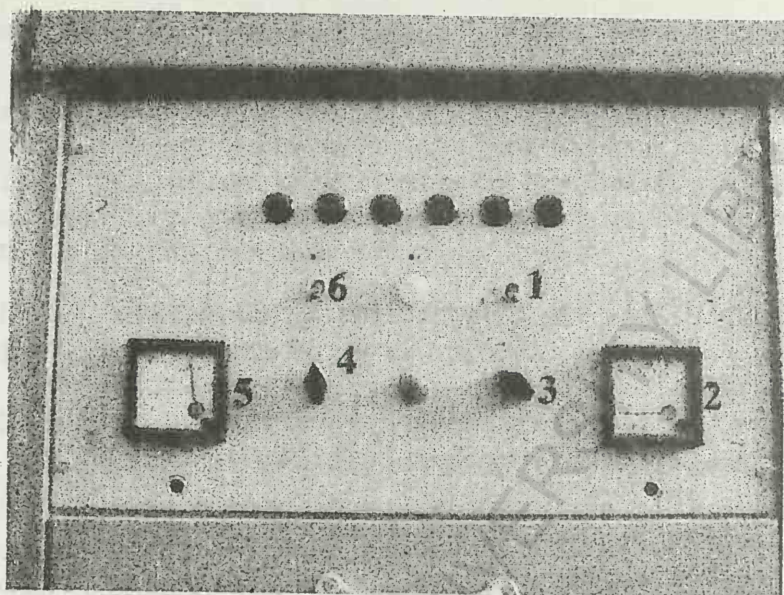
Fig. 17. Intensitatea benzii υ_{OH} (exprimată în unități arbitrare) în funcție de concentrația alcoolului: a) în cazul monomerului, b) în cazul complexului

complexului. Se observă că dependența b), cu toate că nu e liniară, e foarte potrivită pentru determinări de concentrații mici ale alcoolului solvit în tetraclorura de carbon, adică pentru stabilirea purității tetraclorurii de carbon în ce privește urmele de alcool etilic.

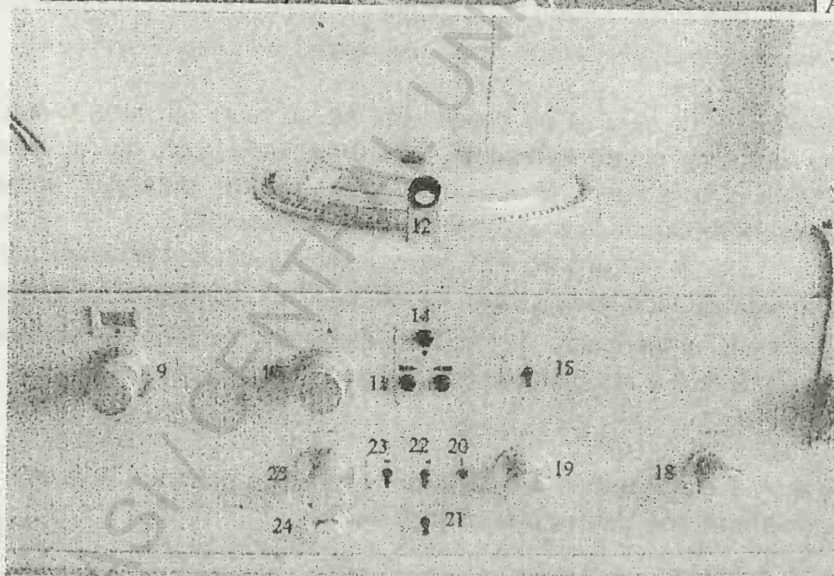
Obs. Și urmele de apă din solvenți ca tetrahidrofuranul pot fi determinate în mod asemănător, banda υ_{OH} a complexului pentru apă fiind situată aproximativ în același domeniu spectral ca și banda corespunzătoare a alcoolului etilic, domeniu în care tetrahidrofuranul nu absoarbe.

VIII.6. Cele mai importante reguli pentru lucrul la spectrofotometrul pentru infraroșu UR-20.

În fig. 15 se prezintă cele trei „panouri" cu comenzile spectrofotometrului UR-20, iar în fig. 16 se prezintă locașul pentru hârtia de înregistrare. S-au numerotat doar comutatoarele (butoanele) ce trebuie acționate.



A)



B)

C)

Fig. 15.

1. Se cuplează sistemul de răcire al sursei de radiații.
2. Cu tamburul (9), panou B, se stabilește o anumită lățime a fantelor, punându-l la început pe diviziunea 8, ce corespunde fantei maxime.
3. Cu tamburul (16), panou B, se aduce mecanic acul inscriptorului în poziția 100 (transmisie 100%)
4. Tamburul (25), al vitezei de parcurgere a spectrului, panou B, se pune pe treapta maximă: 400 cm^{-1}/min. În total sunt 12 trepte de viteză, între 0,4 cm^{-1}/min și 400 cm^{-1}/min.
5. Comutatorul (23), panou B, ce indică sfârșitul de program să fie trecut în poziția de jos.
6. Comutatorul (20), panou B, ce comandă schimbarea automată a preselectorului de radiație, în

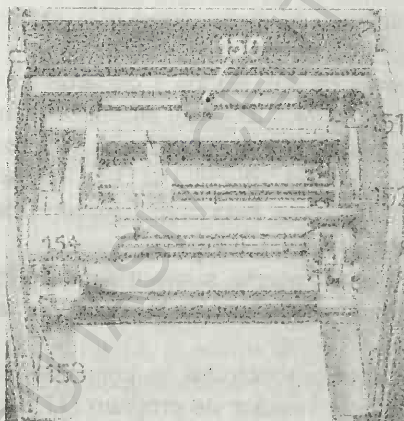


Fig. 16

funcție de domeniul spectral în care se înregistrează spectrul, să fie trecut pe poziția de sus, = I – .

7. Tamburul (18), panou B, ce permite modificarea vitezei de deplasare a hârtiei, se pune pe o treaptă de mijloc (de exemplu 3). Numerele de pe tamburul (18) dau lungimea hârtiei (în mm) necesară pentru înregistrarea unui domeniu spectral de 100 cm^{-1}.
8. Tamburul (24), panou B, ce permite micşorarea de 10 ori a vitezei de parcurgere a spectrului (în poziția 0,1) se trece pe poziția 1.
9. Comutatorul (21), panou B, care în poziția de sus poate declanşa efectuarea unor marcaje pe hârtia înregistratoare din 10 în 10 cm^{-1}, se trece în poziția de jos.
10. Comutatorul (29) al constantei de timp, panou C, se pune pe poziția 1. În acest caz constanta de timp are valoarea cea mai mică, fiind recomandată pentru înregistrări rapide. La înregistrări mai încete, pentru amortizarea „zgomotelor" se va mări constanta de timp (poz. 2 şi 3).
11. Comutatorul (28), panou C, ce cuplează dispozitivul de întârziere, se pune în poziția I (cuplat). Acest dispozitiv micşorează viteza de parcurgere a spectrului când diafragma de măsură şi penița nu pot urmări cu suficientă viteză variațiile de transparență ale probei.
12. Acționând în sus clapele (150) şi (152), fig. 16, se ridică penița înregistratoare cât şi sistemul de antrenare al hârtiei, apoi acționând în sus şi clapa (153), fig. 16, se ridică şi tamburul ce permite înregistrarea scării numerelor de undă. Aceste operații se execută pentru a nu se face înregistrări în timpul verificărilor.
13. Se cuplează spectrometrul cu ajutorul întrerupătorului (15), panou B, punându-l pe poziția , având grijă ca comutatorul (22) să fie în poziția de jos.
14. Se trece comutatorul (22) în poziția de sus pentru a declanşa rotirea discului (117) (panou B) cu scara numerelor de undă, cu viteza stabilită la punctul 4, pentru a fixa frecvența de început a spectrului (înregistrarea spectrului, deci şi rotirea discului (117) cu scara numerelor de undă se face de la frecvențe mici spre frecvențe mari). Pentru citirea frecvenței se utilizează lupa (12), panou B.
15. Pentru aducerea rapidă a frecvenței de început a spectrului în dreptul reperului lupei se pot utiliza butoanele (11), panou B, de „mers rapid înainte" şi „mers rapid înapoi".
16. În urma fixării frecvenței de început a spectrului se comută (22) în poziția de jos. Se are grijă ca clemele selector de program (13) de pe

discul (117) să fie trase spre exterior în domeniile spectrale pe care vrem să înregistrăm spectrul. În domeniile spectrale în care clemele sunt introduse în interior aparatul nu va înregistra spectrul, declanşându-se mişcarea rapidă a roţii.

17. Se aduce vârful indicator (118), de pe discul (117), la numărul de undă maxim al domeniului spectral în care vrem să facem înregistrarea spectrului şi se conectează întrerupătorul basculant „sfârşit de program" (23), panou B.
18. Se conectează alimentarea sursei de radiaţii IR (bastonaşul de silitră) acţionând comutatorul 1, panou A, în poziţia I, de sus.
19. Cu potenţiometrul (3), panou A, se stabileşte un curent convenabil de încălzire a bastonaşului de silitră, curent citit pe ampermetrul (2). Se recomandă treapta 1 sau 2 a potenţiometrului 3.
20. Se conectează instalaţia de amplificare acţionând ştecherul (30), panou C, în poziţia I, de sus.
21. Cu ajutorul potenţiometrului (27) al amplificării grosiere şi al potenţiometrului (26) al amplificării fine (panou C) se stabileşte valoarea optimă a amplificării - o amplificare ceva mai mică decât aceea ce ar face ca acul indicator al inscriptorului să oscileze (să „vibreze").
22. În situaţia când în ambele fascicule de radiaţii nu este nici o cuvă, cu tamburul (10), panou B, se aduce acul inscriptorului la diviziunea 100 (nu se mai umblă la tamburul (16))
23. Cu ajutorul tamburului (19), panou B, se stabileşte, în funcţie de viteza de parcurgere a spectrului (fixată al punctul 4), timpul de deplasare a acului indicator de la diviziunea 0 la diviziunea 100 (transmisă 100%). Valorile posibile ale acestui timp sunt de 4, 16 şi 64 s. Pentru viteza maximă de 400 cm^{-1}/min se va fixa timpul minim, de 4 s. Timpul maxim, de 64 s, se recomandă la viteza cea mai mică, de 0,4 cm^{-1}/min.

    Se recomandă verificarea timpului de 4 s, în situaţia când nu s-au montat cuvele. Se procedează astfel: se închide diafragma din calea radiaţilor ce urmează să treacă prin cuva cu soluţie, situaţie în care peniţa înregistratoare trebuie să „coboare" la diviziunea 0 (transmisie 0 %). Se deschide apoi această diafragmă şi se măsoară timpul necesar ajungerii peniţei la diviziunea 100.
24. Se pregăteşte înregistrarea spectrului acţionând clapele (153) şi (152), fig. 15, în poziţia de jos.
25. Înregistrarea spectrului va începe dacă se comută (22) în sus.

26. Înregistrarea spectrului se va întrerupe automat când se ajunge la frecvenţa maximă, fixată la pct. 17, declanşându-se o sonerie. Pentru oprirea soneriei se acţionează întrerupătorul (23), panou B.
27. La terminarea înregistrărilor se închid (15) şi (30), apoi (27) se trece pe poziţia de zero.
28. Se trece potenţiometrul (3) pe poziţia 1 şi se închide alimentarea sursei, trecând comutatorul (1) în poziţia de jos.
29. Se opreşte sistemul de răcire al sursei de radiaţii.

Atenţie. Să nu se decupleze niciodată instalaţia de climatizare, adică comutatorul (6) să rămână în poziţia de sus, iar (4) să fie în poziţia I, astfel ca voltmetrul (5) să indice tensiunea reţelei (220V).

VIII.7. Spectroscopia IR cu transformată Fourier (FTIR).

Până acum am discutat aşa-numita spectroscopie IR dispersivă, cea mai utilizată în prezent în majoritatea laboratoarelor din ţara noastră. După cum îi şi spune şi numele, elementul de bază a unui aparat ce utilizează metoda dispersivă este monocromatorul.

În ultimele decenii s-a dezvoltat o altă tehnică, aplicată în special pentru spectroscopia IR, Raman şi RMN, ce nu utilizează monocromatoare, în care se înregistrează simultan toate radiaţiile (adică un întreg domeniu de frecvenţe), fie cele emise de o sursă, fie cele ce ies dintr-o substanţă absorbantă. Se vorbeşte de o multiplexare Fourier. Termenul de multiplexare vine din teoria comunicaţiilor, unde acesta indică faptul că un anumit set de informaţii este transportat simultan printr-un singur canal.

Numele lui Fourier e pomenit deoarece semnalul obţinut necesită o prelucrare matematică complicată, utilizând analiza Fourier (integralele lui Fourier). Din acest motiv spectroscopia FTIR s-a dezvoltat relativ târziu (cu toate că bazele ei teoretice s-au pus încă din secolul XIX), o dată cu perfecţionarea mijloacelor de calcul.

O altă caracteristică a acestui tip de spectroscopie este aceea că semnalele (radiaţiile electromagnetice) nu sunt înregistrate în scara Intensitate–frecvenţă (I,ν), ca în spectroscopia tradiţională , ci în scara Intensitate–timp (I,t). Pentru a se face astfel de înregistrări (simultan a

tuturor frecvențelor) trebuie să se realizeze o suprapunere a componentelor monocromatice ale semnalelor, adică o interferență a lor. Iar pentru realizarea interferenței, radiațiile (undele) respective trebuie să fie coerente.

Fie două unde coerente având frecvențele apropiate – una din ele de frecvență ν_1 şi cealaltă de frecvență ν_2. În fig. 17(a) se prezintă graficul variației cu timpul a puterii $P(t)$ a radiației, separat pentru fiecare din cele două unde.

Astfel de curbe (spectre) nu pot fi obţinute în mod experimental cu radiaţiile utilizate în spectroscopie (având frecvenţe de ordinul a 10^{15} Hz pentru UV-VIS şi de 10^{7} Hz în cazul RMN), deoarece nu există receptori care să urmărească variațiile atât de rapide ale puterii P, mărime ce caracterizează intensitatea I a radiației.

În fig.17 (b) este redată situația când cele două unde acționează împreună iar în figurile 17(c), (d) şi (e) se indică reprezentarea spectrelor radiațiilor în scara frecvențelor, aşa cum se obişnuieşte în spectroscopie.

Trecerea de la spectrul din scara frecvențelor la cel din scara timpului, sau invers, este o problemă matematică complicată ce utilizează analiza Fourier. În cazul simplu al unei radiaţii ce conţine doar două componente monocromatice ν_1 şi ν_2, spectrul de tip b) se poate obţine din spectrul e) utilizând relaţia:

$$P(t) = k(\cos 2\pi\nu_1 t + \cos 2\pi\nu_2 t).$$

Pentru a se obţine spectre în funcţie de timp este nevoie de o metodă de a converti (sau de a modula) semnalul de frecvență înaltă într-un semnal de frecvență convenabilă, astfel ca el să poată fi măsurat; această ultimă frecvență trebuind evident să fie proporțională cu cea originală.

Se utilizează diverse metode de modulare a semnalelor pentru diferite domenii ale spectrului undelor electromagnetice. În domeniul optic al spectrelor (deci şi în IR) este utilizat în special interferometrul Michelson.

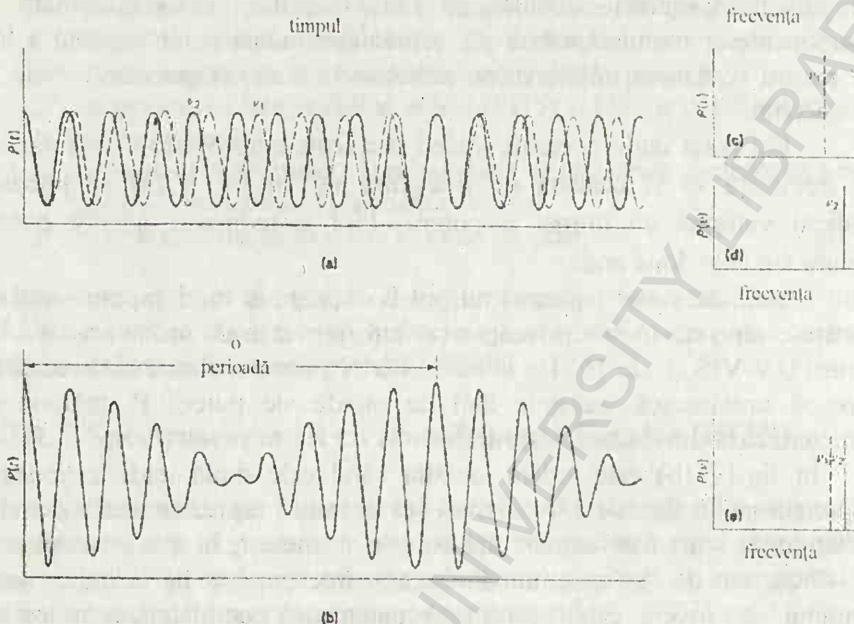


Fig.17. Ilustrarea variaţiei puterii $P(t)$ în funcţie de timp : (a), (b) şi în funcţie de frecvenţă : (c), (d) şi (e).

Să analizăm utilizarea interferometrului Michelson în cazul când sursa emite radiaţii monocromatice de lungime de undă λ. Schema montajului experimental este prezentată în fig. 18.

În poziţia iniţială, O, a oglinzii mobile distanţa M dintre aceasta şi oglinda (semitransparentă) divizoare este egală cu distanţa F dintre aceeaşi oglindă divizoare şi oglinda fixă. În acest caz se va obţine un maxim de interferenţă, adică un curent maxim în detector.

Deplasând oglinda O pe o anumită distanţă d, paralel cu ea însăşi, diferenţa de drum între fascicule care interferă va fi:

$$\delta = 2(M - F) = 2d\ .$$

Maximele de intensitate din detector se vor obţine când:

$$\delta = n\lambda\ ,$$

iar minimele pentru:

$$\delta = \left(n + \frac{1}{2}\right)\lambda,\ n = 0,1,2 \ldots.$$

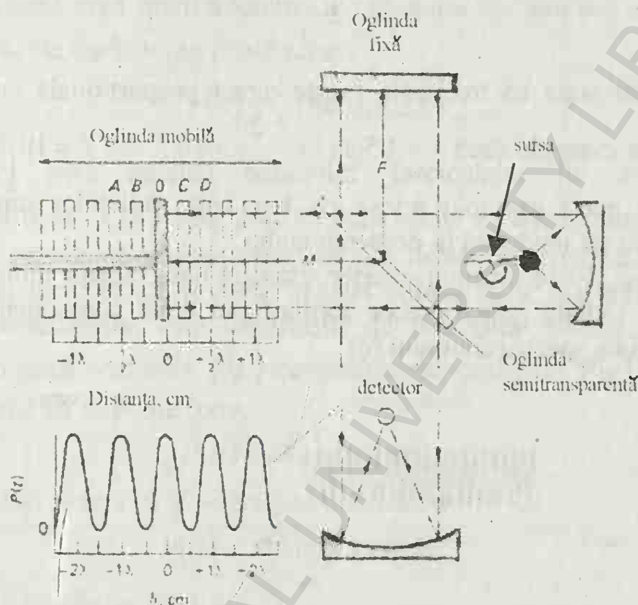


Fig.18. Reprezentarea schematică a utilizării interferometrului Michelson pentru înregistrarea spectrului unei radiații monocromatice, în coordonate intensitate (putere)-timp.

Dacă oglinda mobilă se deplasează cu o viteză constantă, v, atunci: $d = vt$, adică: $\delta = 2vt$.

Când $\delta = \lambda$, detectorul va semnala maximul de interferență de ordinul 1 $(n = 1)$. Astfel, perioada T a semnalului din detector se va obține din relația: $\delta = \lambda = 2vT$, adică:

$$T = \frac{\lambda}{2v}.$$

Frecvența f a semnalului din detector (a interferogramei) va fi:

$$f = \frac{1}{T} = \frac{2v}{\lambda} = 2v\bar{\upsilon}.$$

Ținând seama că $\lambda = \frac{c}{\nu}$, se obține următoarea legătură (relație) dintre frecvența optică a radiațiilor și frecvența f a interferogramei:

$$f = \frac{2v}{c}\nu \ ,$$

relație ce ne arătă că frecvența f este direct proporțională cu frecvența optică ν. De exemplu dacă $v = 1{,}5 cm/s$, $\frac{2v}{c} = 10^{-10} \Rightarrow f = 10^{-10}\nu$.

Din acest exemplu reiese că frecvența radiațiilor din domeniul vizibil și IR este modulată în domeniu audio.

În fig. 19 se prezintă interferogramele unei radiații monocromatice (a), a unei radiații policromatice formate din două componente (b) și a unei radiații cu spectru continuu (c).

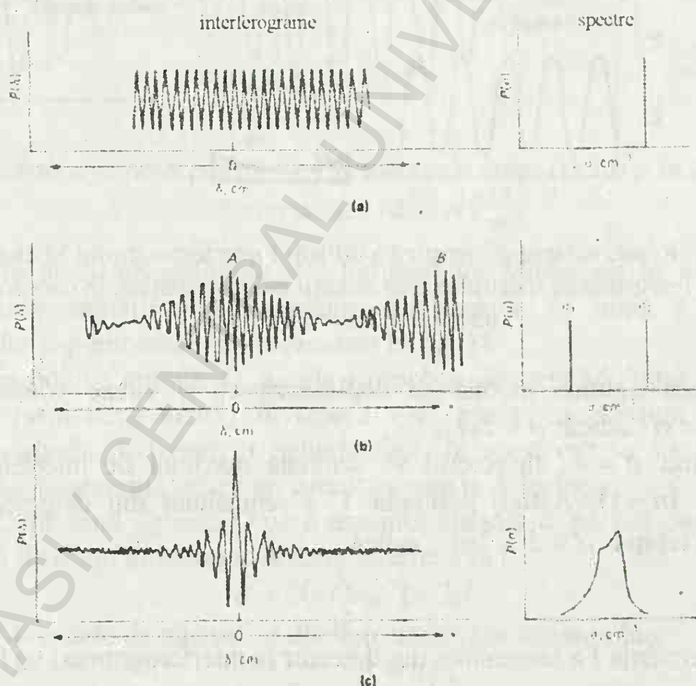


Fig.19. Compararea interferogramelor cu spectrele optice.

Să vedem, în continuare, cum se realizează transformarea Fourier a interferogramelor, adică cum se poate obține spectrul propriu-zis din aceste interferograme.

În cazul unei interferograme a radiațiilor de lungime de undă λ, sau de număr de undă $\bar{v}$, se poate scrie:

$$P(\delta) = \frac{1}{2} P(\bar{v}) \cos 2\pi ft ,$$

unde $P(\bar{v})$ este puterea radiațiilor fasciculului IR incident pe interferometru iar $P(\delta)$ este puterea semnalului interferogramei. Ecuația de mai sus reprezintă un caz ideal, aceasta deoarece divizorul nu împarte fasciculul incident exact în două; în plus trebuie să se mai țină seama că răspunsul detectorului este dependent de frecvență. Pentru aceasta se introduce o nouă variabilă $B(\bar{v})$ ce arată dependența lui $P(\bar{v})$ de factorii amintiți, astfel că se poate scrie:

$$P(\delta) = B(\bar{v}) \cos 2\pi ft .$$

Ținând seama că $f = 2v\bar{v}$, se poate scrie:

$$P(\delta) = B(\bar{v}) \cos 2\pi 2v\bar{v}t .$$

Dar : $v = \dfrac{\delta}{2t}$, astfel că se obține:

$$P(\delta) = B(\bar{v}) \cos 2\pi\delta\bar{v} ,$$

relație ce ne arată dependența magnitudinii interferogramei de diferența de drum δ (sau de timpul t, ținând seama că $\delta = 2vt$) și de frecvența semnalului optic incident.

În cazul interferogramei (b) din fig.19 putem scrie:

$$P(\delta) = B_1(\bar{v}) \cos 2\pi\delta\bar{v}_1 + B_2(\bar{v}) \cos 2\pi\delta\bar{v}_2$$

Pentru o sursă cu spectru continuu, ce dă interferograma (c), vom avea:

(1) $$P(\delta) = \int_{n=-\infty}^{+\infty} B(\bar{v}) \cos 2\pi\bar{v}\delta_n d\bar{v} .$$

Să ne referim, în continuare, la interferograma (c). Pentru a se obține din aceasta spectrul optic este nevoie de-a evalua transformata

Fourier a integralei (1), conform relației:

(2) $$P(\bar{\nu}) = \int_{n=-\infty}^{+\infty} B(\delta)\cos 2\pi\bar{\nu}\delta_n d\delta$$

Astfel, spectroscopia IR cu transformată Fourier constă în înregistrarea mărimii P(δ) în funcție de δ (ecuația (1)) și transformarea matematică a acestei dependențe pentru a da pe $P(\bar{\nu})$ în funcție de $\bar{\nu}$ (ecuația (2)).

După cum arată relația (2), pentru a obține o reprezentare perfectă a spectrului, interferograma ar trebui înregistrată prin deplasarea oglinzii mobile pe o distanță infinită. În practică, totuși, deplasarea trebuie limitată la o valoare finită, d_{max}, astfel că:

$$P'(\bar{\nu}) = \int_{-d_{max}}^{+d_{max}} B(\delta)\cos 2\pi\bar{\nu}\delta_n d\delta \neq P(\nu).$$

Prin această limitare a deplasării, toate trăsăturile interferogramei care sunt situate în afara intervalului ($-d_{max}$, $+d_{max}$) sunt suprimate. Pentru ca efectul acestei trunchieri a interferogramei asupra spectrului să fie cât mai redus, porțiunea rămasă din interferogramă se corectează printr-un procedeu numit apotizare. Pentru aceasta se înmulțește B(δ) cu o funcție de retardare (de apotizare) potrivit aleasă.

Trebuie specificat faptul că unul din efectele cele mai importante ale trunchierii interferogramei este înrăutățirea rezoluției , deoarece puterea de rezoluție $\Delta\bar{\nu}$ este dată, cu aproximație, de relația:

$$\Delta\bar{\nu} \cong \frac{1}{d_{max}}.$$

Astfel, pentru a obține o rezoluție de 0,5 cm^{-1}, este suficientă o deplasare maximă de 2 cm, pe când pentru atingerea unei rezoluții înalte, de 0,01cm^{-1} de exemplu, oglinda mobilă trebuie deplasată pe o distanță de cel puțin 100 cm, în jurul poziției pentru care δ=0.

Dacă în drumul unuia din cele două fascicule coerente se interpune proba, o substanță care absoarbe anumite componente ale radiației policromatice provenite de la sursa de radiații IR (sursă cu spectru continuu), aspectul interferogramei va fi diferit de acela al

interferogramei obținute în absența substanței. Transformata Fourier a acestei noi interferograme ne va da spectrul de absorbție al substanței. Dacă substanța este dizolvată într-un solvent, din spectrul soluției (substanță+solvent+geamurile cuvei) trebuie să se scadă spectrul solventului şi al geamurilor, adică e nevoie să se înregistrează şi interferograma: solvent+cuvă.

Cazul discutat ar corespunde unui spectrofotometru cu un singur fascicul. S-au construit şi spectrofotometre FTIR cu două fascicule care constau de fapt din două interferometre, având în comun oglinda mobilă.

Să vedem în continuare care sunt principalele avantaje ale utilizării spectrofotometrelor FTIR.

a) Un prim avantaj este creşterea raportului semnal-zgomot, în condițiile în care zgomotul este datorat doar detectorului (care este cuplat şi cu un amplificator), în care caz acesta (zgomotul) este un proces aleator. Se ştie că pentru a se creşte raportul semnal-zgomot, când intervin procese aleatoare, e nevoie să se facă mai multe determinări (n) astfel că vom putea scrie:

$$\frac{S}{Z}=\frac{S_n}{Z_n}\sqrt{n} ,$$

unde S_n şi Z_n sunt media semnalului şi a zgomotului.

În cazul spectrofotometrelor IR dispersive înregistrarea unui spectru durează destul de mult, un timp de ordinul a mai multor minute, astfel că repetarea măsurătorilor ar dura foarte mult. Înregistrarea unei interferograme cât şi prelucrarea ei matematică durează mult mai puțin. Din acest motiv în timpul T, cât se înregistrează un spectru IR prin metoda dispersivă, se pot înregistra N interferograme. Deci pe durata T raportul S/Z e mai mare în cazul utilizării spectrofotometriei FTIR de $\sqrt{N}$ ori. Acest avantaj a primit denumirea de avantajul Fellgett.

b) Se ştie că în cazul spectrofotometrelor dispersive prezența fantelor limitează drastic puterea radiantă ce ajunge la detector. Deoarece în spectrofotometrele FTIR nu există fante, puterea radiantă ce ajunge la detector va fi mult mai mare, astfel că se pot utiliza şi surse slabe de radiații, cum ar fi de exemplu stelele.

Acest avantaj a primit denumirea de avantajul Jacquinot. El a fost

sesizat pentru prima dată de astronomi, încă din secolul XIX , dar complexitatea (greutatea) prelucrării matematice a interferogramelor a întârziat aplicarea acestei tehnici. Ea a început să se aplice o dată cu crearea calculatoarelor electronice.

c) Deoarece majoritatea spectrofotometrelor FTIR moderne sunt prevăzute cu posibilitatea unui control riguros al poziției oglinzii mobile, utilizând în acest scop un laser, se mărește apreciabil precizia cu care se măsoară numerele de undă. Această facilitate a primit denumirea: „avantajul Connes".

Tot ce s-a prezentat în acest paragraf se referă doar la o nouă tehnică de înregistrare a spectrelor IR, așa că tot ce s-a expus în paragrafele VIII.2 și VIII.3 relativ la prepararea probelor, alegerea solvenților și efectuarea analizelor rămâne valabil și în cazul utilizării acestei tehnici.

Cap.IX. Analiza spectrală utilizând spectrele electronice moleculare de absorbţie şi emisie din ultravioletul apropiat şi vizibil (UV-VIS).

IX.1. Stările energetice ale moleculelor organice poliatomice.

Ne vom referi doar la compuşii organici (formaţi în principal din atomi de C şi H) deoarece aceştia au spectre electronice în domeniile ultraviolet apropiat (mergând până la 2000 Å) şi vizibil, domenii în care lucrează majoritatea aparatelor utilizate în scopuri analitice. Dintre compuşii organici vom lua în considerare doar pe cei ce au molecule poliatomice (formate dintr-un număr mare de atomi), aceştia fiind mai frecvent întâlniţi în diverse analize.

Vom analiza în continuare doar procesele de excitare sub acţiunea unor fluxuri de radiaţie de intensitate nu prea mare, în care caz molecula absoarbe un singur foton, adică efectuează o singură tranziţie. (În cazul iradierii substanţei cu un fascicul laser sunt frecvente procesele bi- sau multi-fotonice, când molecula absoarbe doi sau mai mulţi fotoni). În cazul acestor procese excitarea moleculei are loc ca urmare a tranziţiei unui singur electron dintr-o stare energetică în alta (aproximaţia monoelectronică).

Nu orice electron din moleculă poate efectua o tranziţie de absorbţie sub acţiunea unor radiaţii excitatoare din UV-VIS (energia fotonilor respectivi fiind de câţiva eV) ci doar acela pentru care diferenţa de energie dintre starea electronică excitată, în care poate trece el, şi starea electronică pe care se află (aceste stări fiind de fapt nivelele electronice ale moleculei) este egală (sau ceva mai mare) cu energia fotonului excitator.

Gruparea (de atomi) din moleculă ce conţine electronul capabil să efectueze tranziţia de absorbţie în UV-VIS a fost denumită grupare cromoforă sau cromofor. Vom da câteva exemple de cromofori mai des întâlniţi precum şi maximele benzilor de absorbţie λ_{abs}^{max} în cazul când aceşti cromofori sunt izolaţi

În cazul compuşilor a căror molecule conţin un cromofor de acelaşi tip, energiile tranziţiilor electronice vor fi apropiate (ele

depinzând şi de natura radicalilor ataşaţi legăturilor libere), adică maximele benzilor de absorbţie ale acestora λ_{abs}^{max} vor avea aproximativ aceeaşi lungime de undă. În plus, pentru toţi aceşti compuşi intensitatea absorbţiei, măsurată de exemplu prin extincţia molară pentru λ_{abs}^{max} (ε_{max}), are aproximativ aceeaşi valoare.

Gruparea	λ_{abs}^{max} (nm)
$>C-C<$	150
$>C=C<$	185
$-C\equiv C-$	175, 215
$>C=O$	270
$-C(=O)OH$	290
$-OH$	186
$-NO_2$	268,5
$-N=N-$	345
benzen	200, 268

Cele două aspecte semnalate mai sus se referă evident la cazul când compuşii respectivi sunt fie în stare de vapori, fie dizolvaţi în acelaşi solvent deoarece solventul, ca şi în cazul spectrelor IR, poate modifica atât pe λ_{abs}^{max} cât şi pe ε_{max}.

Sunt destule cazuri când într-o moleculă sunt mai mulţi cromofori de acelaşi fel sau de tipuri diferite. Dacă cromoforii nu sunt conjugaţi (adică nu interacţionează), de exemplu când sunt separaţi în moleculă prin două sau mai multe legături simple, atunci spectrul de absorbţie obţinut va reprezenta o însumare a spectrelor fiecărui cromofor. Când

cromoforii sunt conjugați energia tranziției electronice în general scade adică λ_{abs}^{max} suferă o deplasare batocromă. Astfel, de exemplu, dacă la etilenă și acetilenă $\lambda_{abs}^{max} \cong 180$ nm, la vinilacetilenă $>C=\dot{C}-C\equiv C-$: $\lambda_{abs}^{max} \cong 220$ nm. Prezența unor sisteme cromofore conjugate în moleculele diverșilor compuși va avea același rezultat ca și prezența unor cromofori simpli.

Deci, în principiu, analiza calitativă sau structurală s-ar putea face pe baza datelor (tabelate) privind spectrele de absorbție ale diferitelor grupări cromofore, la fel cum se procedează în spectroscopia IR, unde se utilizează așa-numitele frecvențe caracteristice de grup. Totuși, așa cum vom vedea mai jos, spectrele electronice, spre deosebire de spectrele IR, sunt total nepotrivite pentru astfel de analize (excepție făcând unii compuși mai simpli).

Tranzițiile de absorbție ale electronului ce aparține grupării cromofore sau a unui sistem cromofor conjugat (și care determină de fapt tranzițiile electronice ale moleculei) se notează, pentru simplitate, în funcție de orbitalii moleculari între care are loc tranziția. De exemplu dacă electronul trece de pe orbitalul π (de legătură) pe orbitalul π* (de antilegătură) atunci tranziția se notează astfel: π→π* iar starea excitată se notează prin (π,π*).

În afară de tranzițiile π→π*, la moleculele organice se mai întâlnesc tranzițiile n→π*, n→σ* și σ→σ*. Ultimele două necesitând o energie mare (benzile de absorbție corespunzătoare acestor tranziții sunt situate la lungimi de undă mai mici de 200 nm), rămân practic de interes în scopuri analitice doar tranzițiile π→π* și n→π*.

Pentru a ne reaminti de orbitalii moleculari de legătură (σ și π), de antilegătură (σ^* și π^*) și de cei de nelegătură (n) să figurăm (aproximativ) orbitalii moleculari ai grupării carbonil dintr-o moleculă organică simplă și anume cea de aldehidă formică: $H_2C=O$ (fig. 1).

Orbitalii de nelegătură (n) sunt orbitalii unor electroni ce nu participă la legătura chimică, de exemplu o parte a electronilor din grupele C=O, C=N, C=S, N=N și N=O (Se obișnuiește uneori ca electronii neparticipanți la legătură să fie notați cu puncte : $\begin{matrix}H\\H\end{matrix}\!>C=\ddot{O}:$).

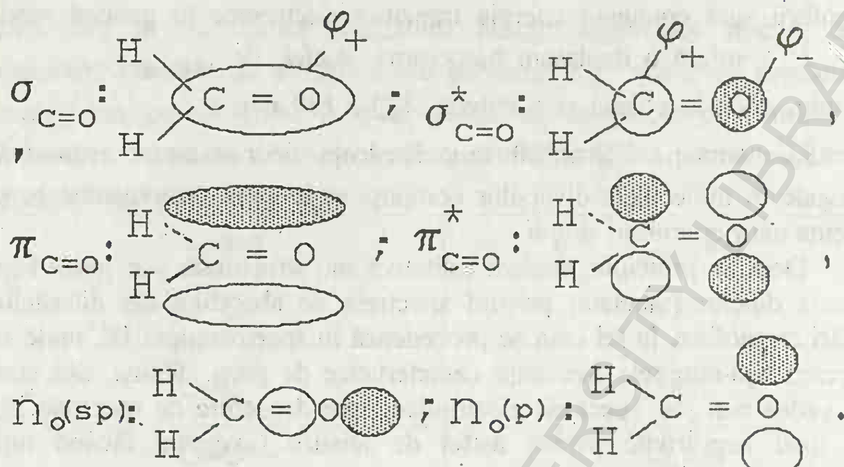


Fig. 1. Orbitalii grupării carbonil din molecula de aldehidă formică.

În cazul moleculei de aldehidă formică întâlnim o tranziție de tip $n \rightarrow \pi^*$ căreia îi corespunde o bandă de absorbție având maximul la circa 280 nm (o tranziție de acelaşi tip se observă şi la acetonă: $\begin{matrix} H_3C \\ H_3C \end{matrix} > C = O$, cu maximul benzii de absorbție tot la circa 280 nm). Să figurăm această tranziție pe o diagramă a nivelelor corespunzătoare orbitalilor grupării carbonil din moleculă - fig.2 (o diagramă de acest fel este obținută din calcule cuanto-mecanice). Nivelele respective vor fi chiar nivelele electronice ale moleculei.

Starea din care se efectuează tranziția electronului se consideră drept stare electronică fundamentală a moleculei, ea notându-se cu S_0. În cazul moleculelor organice această stare este o stare de singlet, datorită faptului că toți electronii sunt cuplați, astfel că spinul total S este nul. Starea electronică excitată poate fi sau de singlet, când electronul excitat nu îşi schimbă orientarea spinului, sau de triplet când electronul excitat îşi schimbă orientarea spinului.

Nivelele excitate de singlet se notează astfel: S_1, S_2, S_3, iar cele de triplet: T_1, T_2,..(starea T_0 nu există). Nivelul de triplet T_1 este mai coborât (are energia mai mică) decât nivelul de singlet S_1. La fel se întâmplă şi în cazul nivelelor T_2 şi S_2 respectiv T_3 şi S_3 etc.

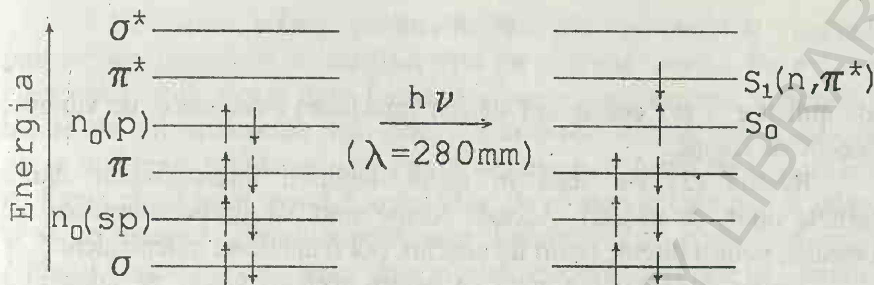


Fig.2. Nivelele electronice ale moleculei de aldehidă formică.

Revenirea moleculei dintr-o stare electronică excitată (stare obţinută prin absorbţia de radiaţii UV-VIS) în starea fundamentală se poate face fie neradiativ (fără să se emită radiaţii) fie prin emisie de radiaţii. În ultimul caz vorbim de fotoluminescenţă (fluorescenţă şi fosforescenţă).

Banda de absorbţie corespunzătoare tranziţiilor $n\rightarrow\pi^*$ este de obicei slabă. De asemenea şi fluorescenţa din starea (n,π^*) este puţin intensă, iar randamentul cuantic al fluorescenţei este mic. Deci fluorescenţa moleculelor organice este legată, în principal, de stările (π,π^*), adică de prezenţa unor electroni π, nelocalizaţi, electroni întâlniţi la hidrocarburile nesaturate cât şi la cele aromatice. Majoritatea compuşilor fluorescenţi aparţin clasei de hidrocarburi aromatice.

IX.2. Tranziţiile şi spectrele electronice ale moleculelor organice poliatomice aflate în soluţie.

Să analizăm în continuare procesele de absorbţie şi emisie (fotoluminescenţă) utilizând o diagramă completă a nivelelor de energie a moleculei (aşa-numita diagramă Jablonski) deoarece, precum se ştie, pe lângă energie electronică molecula mai posedă energie de vibraţie şi energie de rotaţie.

În aproximaţia Born-Oppenheimer funcţia de undă ψ a unei molecule şi energia ei E se pot scrie astfel:

(1) $$\psi = \psi_e \cdot \psi_v \cdot \psi_r,$$

(2) $$E = E_e + E_v + E_r,$$

unde indicii e, v şi r corespund stărilor (nivelelor) electronice, de vibraţie, respectiv de rotaţie.

Relaţia (2) s-a scris în cazul neglijării interacţiunilor dintre diferitele tipuri de mişcări. Această relaţie arată că stările energetice ale moleculei, pentru diferite tipuri de mişcări, pot fi analizate independent.

Teoria şi experienţa arată că pentru aceleaşi valori ale numerelor cuantice ce cuantifică cele trei tipuri de energii, avem următoarele relaţii:

$$E_e >> E_v >> E_r.$$

Vom discuta cazul când substanţa se află în soluţie (sau cum se mai spune – în faza condensată) deoarece majoritatea analizelor, utilizând spectrele electronice din UV-VIS, se fac în astfel de situaţii. Concentraţiile utilizate pentru trasarea unui spectru de absorbţie sunt de circa 10^{-4} M/l, iar pentru trasarea unui spectru de fluorescenţă sunt de circa 10^{-5} M/l. În aceste condiţii se vor putea neglija interacţiunile dintre moleculele substanţei solvite, care ar putea să modifice energia electronică a moleculei, faţă de cazul când ea ar fi liberă.

Vom neglija de asemenea interacţiunile dintre moleculele solvitului şi ale solventului, interacţiuni ce modifică de obicei energia electronică a moleculei solvite. Vom ţine seama doar de interacţiunile ce modifică (micşorează) energia de vibraţie a moleculei în urma ciocnirilor, fie cu moleculele de acelaşi tip (de solvit), fie cu moleculele de solvent.

Trebuie luat în considerare şi faptul că în urma ciocnirilor numeroase pe care le suferă molecula de solvit, în special cu moleculele de solvent, nivelele de vibraţie cât şi cele de rotaţie se lărgesc. Această lărgire e mult mai mare decât în cazul când se înregistrează spectrele IR de absorbţie, când se utilizează straturi foarte subţiri de soluţie, sub 1mm (la înregistrarea unui spectru electronic sunt necesare grosimi ale stratului absorbant de la circa 0,5 cm până la câţiva cm).

Lărgirea nivelelor de vibraţie şi rotaţie apare şi din cauza interacţiunii dintre mişcarea electronică cu cea de vibraţie, respectiv cu cea de rotaţie, interacţiune mai puternică în stările electronice excitate.

Ne vom referi, pentru început la aşa-numitele <u>molecule poliatomice complexe</u> la care nivelele de vibraţie, pentru fiecare stare electronică, sunt foarte dese formând o succesiune aproape continuă de nivele de vibraţie-rotaţie (nivelele pierzându-şi practic individualitatea, nu se mai pune problema unor reguli de selecţie). Astfel de molecule nu au formă plană încât există o multitudine de moduri în care pot să vibreze şi să se rotească. Pentru simplificarea discuţiilor vom construi diagrama Jablonski luând în considerare doar nivelele electronice şi cele de vibraţie

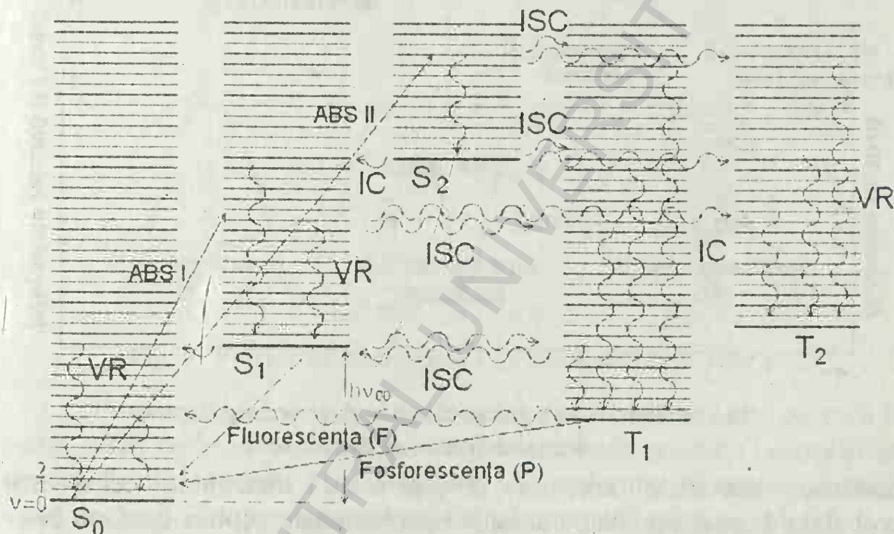


Fig. 3. Diagrama Jablonski şi tranziţiile unei molecule aflată în soluţie.

Pentru început vom analiza spectrul electronic de absorbţie. La temperaturi joase şi, cu aproximaţie, chiar la temperatura camerei putem considera că, în starea electronică fundamentală, molecula se află pe nivelul de vibraţie $v=0$ care coincide practic cu nivelul pur electronic S_0 (adică energia de vibraţie a moleculei este foarte mică iar cea de rotaţie neglijabilă).

Iradiind soluţia substanţei cu radiaţii de diverse frecvenţe obţinute cu ajutorul unui monocromator, utilizând o sursă cu spectru continuu (pentru UV se utilizează o lampă cu deuteriu sau hidrogen molecular iar pentru VIS o lampă cu incandescenţă), o moleculă a acesteia poate trece

pe unul din nivelele electronice excitate de singlet (S_1 sau S_2), respectiv pe unul din nivelele de vibrație ale acestora, sau altfel spus se realizează tranzițiile $S_0 \rightarrow S_1$, $S_0 \rightarrow S_2$. Tranzițiile $S_0 \rightarrow T_1$, $S_0 \rightarrow T_2$ etc. sunt interzise de regula de selecție asupra spinului. Popularea nivelelor T_1, T_2... are loc ca urmare a unei migrări a energiei din stările de singlet, cum vom vedea mai jos.

Ca rezultat al absorbției se obține prima bandă electronică de absorbție (**ABS.I**), respectiv a doua bandă (**ABS.II**) (fig. 4), niște benzi

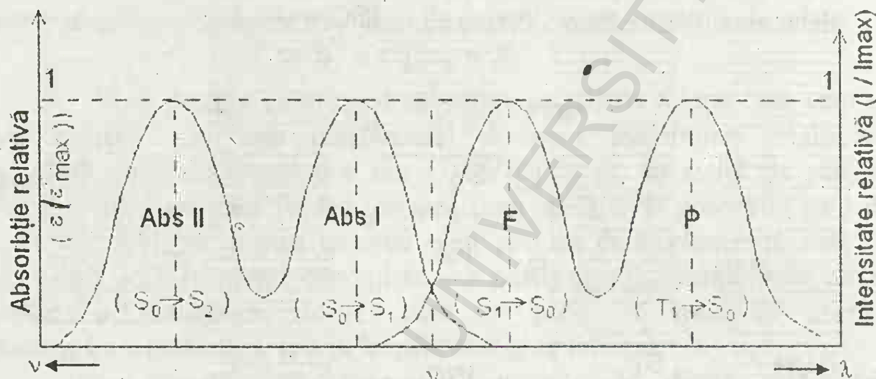


Fig. 4. Benzi electronice (observabile) normate ale unei molecule poliatomice complexe.

continue, maximele acestora corespunzând tranzițiilor celor mai probabile. Forma continuă a acestor benzi se poate explica conform celor discutate privind nivelele de vibrație-rotație. De obicei benzile de absorbție I și II se suprapun mai mult decât în cazul ipotetic (și ideal) prezentat în fig. 4 (sunt și unele cazuri când ele nu se suprapun). Desigur că intensitățile lor nu sunt aceleași, dar le-am prezentat, cum se obișnuiește uneori, luând pe ordonată $\varepsilon/\varepsilon_{max}$ pentru ambele benzi (benzi „normate").

Nu s-au luat în considerare tranzițiile $S_0 \rightarrow S_3$, $S_0 \rightarrow S_4$,... deoarece acestea necesită, la aproape toate moleculele organice, radiații excitatoare cu $\lambda < 200$ nm, dintr-un domeniu spectral în care aparatele uzuale utilizate pentru analize spectrale nu lucrează.

Pentru a nu încărca prea mult figura 3 s-a reprezentat o singură tranziție de absorbție, atât pentru $S_0 \rightarrow S_1$, cât și pentru $S_0 \rightarrow S_2$.

Molecula odată ajunsă într-o stare excitată îşi poate pierde energia de excitare pe mai multe căi, aşa cum se vede din fig. 5:

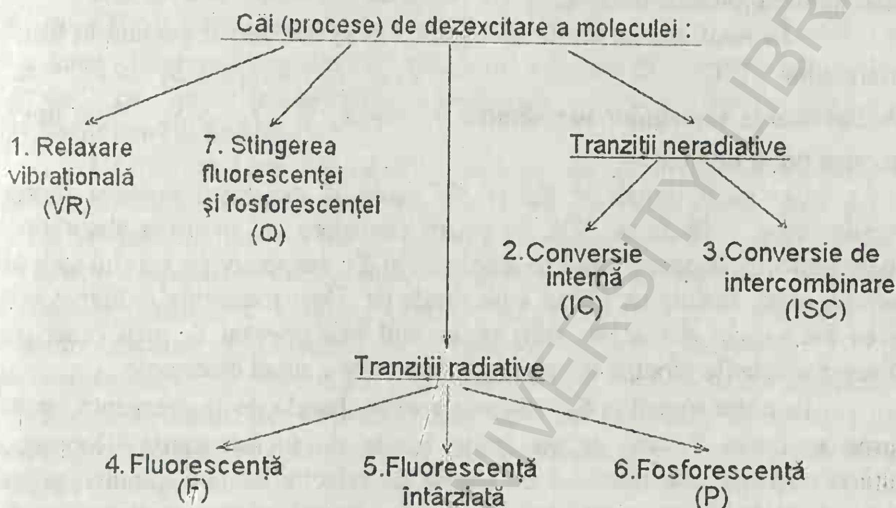


Fig. 5. Procese de dezexcitare a moleculei aflată în soluţie.

Procesele 1, 2, 3 şi 7 se realizează în urma ciocnirilor pe care le poate suferi molecula excitată cu alte molecule din soluţie (1-ciocniri cu moleculele de solvent, 2 şi 3-ciocniri cu molecule de aceeaşi specie, adică de solvit, 7-ciocniri cu molecule de „impurităţi" aflate în soluţie).

Durata acestor ciocniri este de ordinul a 10^{-13}s, deci mult mai mică decât timpul de viaţă al unei stări excitate, care este de ordinul a 10^{-9}-10^{-6}s pentru stările de singlet şi de ordinul a 10^{-6}-10^{+6}s pentru stările de triplet.

În urma proceselor de tip 1 molecula îşi pierde energie de vibraţie trecând pe nivelul v=0 al stării electronice respective, înainte de a se realiza tranziţiile radiative (tranziţiile VR - fig. 3).

În cazul proceselor 2 şi 3 energia de excitare poate să migreze de la o moleculă la alta, între nivele izoenergetice de vibraţie-rotaţie. Deoarece prin aceasta energia totală a sistemului (a ansamblului de molecule) nu se schimbă, nu are loc o emisie de radiaţie.

În cazul conversiei interne (IC) tranziţia neradiativă are loc între

nivelele de aceeaşi energie şi de aceeaşi multiplicitate,iar în cazul conversiei de intercombinare (ISC) tranziţia neradiativă are loc între două stări de multiplicitate diferită.

În felul acesta stările de triplet T_1, T_2 etc se vor popula în urma tranziţiilor ISC: $S_1 \sim> T_1$, $S_1 \sim> T_2$, $S_2 \sim> T_1$, $S_2 \sim> T_2$ etc. Probabilitatea tranziţiilor neradiative $S_1 \sim> S_0$ şi $T_1 \sim> S_0$ fiind mică acestea pot fi neglijate.

Deoarece tranziţiile IC şi ISC sunt şi ele nişte procese foarte rapide, ca şi cele de tip VR, se poate considera că, în urma absorbţiei, toate moleculele ajung rapid în stările S_1 şi T_1, respectiv pe nivelul v=0 al acestor stări, înainte ca ele să emită radiaţie. Deci tranziţiile radiative vor avea loc tocmai din aceste stări pe nivelul fundamental S_0, mai exact pe diverse nivele de vibraţie corespunzătoare acestui nivel electronic.

În urma tranziţiei $S_1 \rightarrow S_0$ se va emite banda de fluorescenţă iar în urma tranziţiei $T_1 \rightarrow S_0$ se va emite banda de fosforescenţă. Deoarece ultima tranziţie este interzisă de regula de selecţie asupra spinului ea va avea o probabilitate mică, iar intensitatea benzii corespunzătoare va fi mult mai slabă, în condiţii obişnuite, decât a benzii de fluorescenţă.

Conform celor discutate mai sus relativ la mecanismul emisiei fluorescenţei şi fosforescenţei de către moleculele aflate în faza condensată, pot fi explicate două proprietăţi importante ale spectrelor de fotoluminescenţă:

a) Banda de fluorescenţă este situată întotdeauna la lungimi de undă mai mari decât banda de absorbţie, iar banda de fosforescenţă la lungimi de undă mai mari decât primele două (de obicei banda de fluorescenţă se suprapune parţial cu banda I de absorbţie iar cea de fosforescenţă cu cea de fluorescenţă, aşa cum se vede din fig. 4).

b) Poziţiile în spectru ale benzilor de fluorescenţă şi fosforescenţă nu depind de frecvenţa radiaţiilor excitatoare. Aceasta înseamnă că indiferent cu ce fel de radiaţii se face excitarea fotoluminescenţei, putându-se utiliza chiar radiaţii având un spectru continuu (cu condiţia, bineînţeles, ca aceste radiaţii să fie absorbite de moleculă, adică să fie „situate" în banda ei de absorbţie) spectrul de fluorescenţă şi cel de fosforescenţă se va obţine întotdeauna în acelaşi loc. Desigur că intensitatea acestor benzi va depinde de lungimea de undă a radiaţiilor

excitatoare (λ_{exc}), ea fiind maximă pentru acele λ_{exc} pentru care absorbția va fi maximă.

Din diverse considerente (unul din ele fiind suprapunerea benzilor **F** cu **ABS.I**, altele rezultând din discuțiile ulterioare) se preferă ca excitarea fotoluminescenței să se facă cu radiații „monocromatice" (gradul de monocromaticitate depinzând fie de filtrul, fie de monocromatorul utilizat).

Din proprietatea b) rezultă o metodă simplă de a verifica dacă o substanță fluorescentă conține sau nu impurități fluorescente (sau dacă avem un amestec de mai multe substanțe fluorescente) cât și faptul dacă substanța respectivă suferă unele transformări ireversibile sub acțiunea radiațiilor excitatoare. (Trebuie precizat că pentru obținerea spectrelor de fotoluminescență moleculară se utilizează radiații excitatoare cu o intensitate mult mai mare decât a acelora ce sunt folosite pentru obținerea spectrelor de absorbție. O primă cauză ar fi concentrațiile foarte mici de substanță necesare în spectroscopia de fluorescență, altele vor fi precizate ulterior).

Dacă substanța (mai exact o anumită cantitate din aceasta) ar suferi transformări ireversibile, adică nu revine la forma inițială după întreruperea excitării, înseamnă că se obține altă substanță și putem vorbi de o reacție fotochimică; desigur că acestea nu sunt de dorit în cazul efectuării analizelor (astfel de reacții pot apare uneori în cazul utilizării anumitor solvenți).

Metoda simplă ce utilizează proprietatea b) constă în compararea spectrelor de fluorescență (și fosforescență) înregistrate pentru mai multe λ_{exc}, spectre care ar trebui să fie identice dacă substanța e pură.

Pe lângă fluorescența obișnuită discutată mai sus (numită și promptă) care este un proces de viață scurtă, se poate emite și o fluorescență de viață lungă, numită fluorescență întârziată. Spectrele (benzile) celor două tipuri de fluorescență coincid.

În apariția fluorescenței întârziate este implicat nivelul de triplet T_1. Se întâlnesc două situații, adică două tipuri de fluorescență întârziată:

a) Fluorescența întârziată de tip **P**. Ea apare în urma conversiei de intercombinare $T_1 \sim> S_0$. Pentru a se realiza acest proces, starea T_1 trebuie activată termic (prin ciocniri), cel puțin până la nivelul cu v=0 al stării S_1 (fig. 6).

b) Fluorescența întârziată de tip **E** apare în urma interacțiunii (ciocnirii) a două molecule aflate în stările T_1, când energia trece de la una la alta (fig. 7).

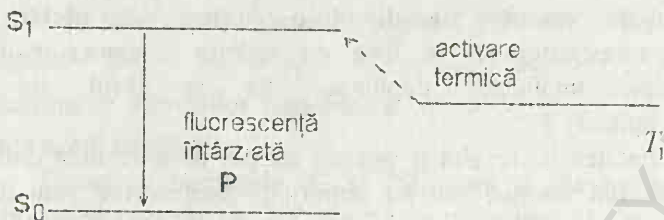


Fig. 6. Mecanismul emisiei fluorescenței întârziate de tip P.

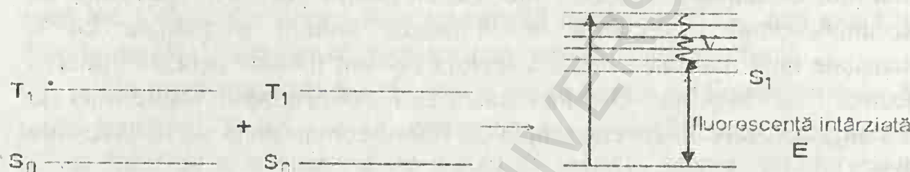


Fig. 7. Mecanismul emisiei fluorescenței întârziate de tip E.

Principalele procese care duc la stingerea (micșorarea) intensității fluorescenței și fosforescenței moleculelor aflate în soluții lichide sunt următoarele:

1. Stingeri fotochimice (prin procese ireversibile):
   a) formarea unor compuși stabili noi,
   b) descompunerea moleculelor substanței.
2. Stingeri fotofizice (prin procese reversibile):
   a) stingerea de concentrație (explicată prin formarea, la concentrații mari ale solvitului, a unor noi compuși de tipul MM*, numiți excimeri, care fie emit fluorescență într-un alt domeniu spectral decît compusul M, fie nu sunt fluorescenți; M*= compus M excitat)
   b) stingerea datorită unor impurități (explicată prin formarea unor compuși de tipul M*Q, numiți exciplecși, Q fiind impuritatea din soluție).

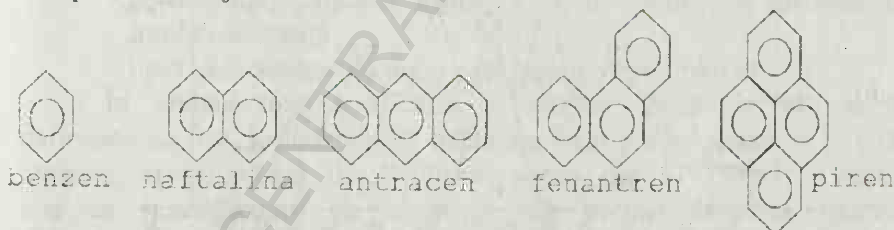
În ambele cazuri de stingeri fotofizice compușii nou formați (compuși de ciocnire) există atât timp cât M este excitat, ei disociindu-se

în urma dezexcitării lui M.

Procesele de stingere a fluorescenței și fosforescenței pot fi diminuate, în cazul analizelor, dacă se iau măsurile corespunzătoare dar nu pot fi niciodată complet eliminate. Deoarece starea T_1, de pe care se emite fosforescența, are o energie mai mică decât a stării S_1, ea va fi mult mai „expusă" stingerii. Din acest motiv fosforescența și fluorescența întârziată nu se pot observa, de obicei, la temperatura camerei și în soluții lichide ci doar la temperaturi foarte scăzute, în soluții înghețate, în care caz agitația termică este foarte redusă deci și ciocnirile sunt diminuate.

Deci, practic, la temperatura camerei fotoluminescența moleculară se manifestă doar prin emisia fluorescenței prompte numită simplu fluorescență.

Pe lângă spectre de absorbție și fluorescență continue (benzi largi cu un singur maxim), care sunt caracteristice moleculelor poliatomice complexe, mai putem întâlni și spectre „structurate", în care caz în banda largă se evidențiază un număr de „picuri" (umere), având și ele o anumită lărgime, constituind așa-numita structură de vibrație a benzii electronice. Astfel de spectre aparțin moleculelor poliatomice de complexitate medie, de obicei molecule a căror structură e plană. Structura plană este dată, în majoritatea cazurilor, de inelele benzenice legate între ele ca în exemplele de mai jos:



Pentru astfel de molecule nivelele de vibrație sunt mai rare încât se pot evidenția tranzițiile dintre acestea. În cazul antracenului, de exemplu, benzile F și Abs.I au forma ca în fig. 8 b), în fig. 8 a) prezentându-se și o diagramă a nivelelor de vibrație, fără a lua în considerare lărgimea lor și prezența nivelelor de rotație.

În cazul unui număr mare de molecule poliatomice se constată că există o așa-numită simetrie de oglindă între banda de fluorescență și banda de absorbție de la lungimi de undă mari (banda I), această simetrie

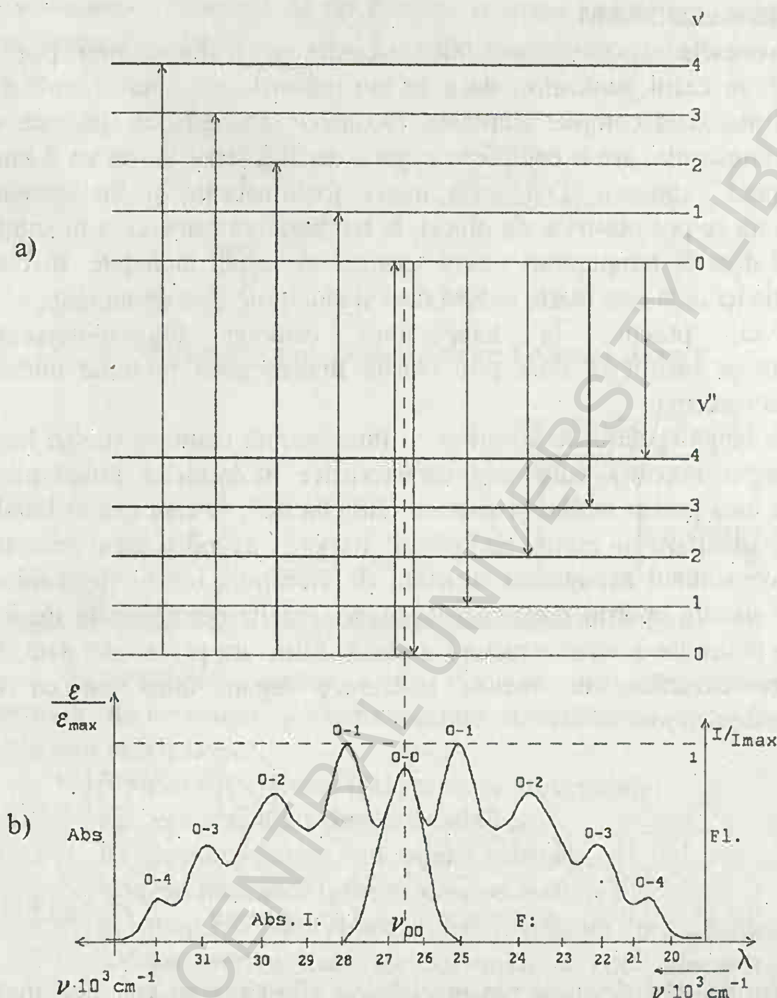


Fig. 8. Structura de vibrație a unei benzi electronice.

realizându-se în raport cu frecvența tranziției electronice pure ν_{00}: vezi benzile respective din figurile 4 și 8 a) , când s-a presupus existența unei astfel de simetrii. Existența acestei simetrii ne ajută în multe cazuri să "extragem" banda I de absorbție dintr-o bandă largă ce se obține prin suprapunerea, într-o mai mică sau într-o mai mare măsură, a benzilor I și

II, cum se întâmplă la foarte multe molecule.

IX.3. Consideraţii generale privind analiza calitativă utilizând spectrele electronice din UV-VIS.

Metoda de analiză ce se bazează pe spectrele de absorbţie din UV-VIS e mult mai utilizată în prezent decât metoda ce se bazează pe spectrele de fotoluminescenţă (majoritatea laboratoarelor din ţară utilizează doar prima metodă), cu toate că sensibilitatea celei de a doua metode e mult mai mare. Acest lucru se datorează în primul rând faptului că nu toţi compuşii organici ce urmează să fie determinaţi sunt şi fluorescenţi, în schimb toţi absorb (în ultimul timp acest inconvenient a fost înlăturat prin utilizarea unor reactivi specifici ce transformă compuşii nefluorescenţi în compuşi fluorescenţi).

Dintre alte cauze care au determinat rămânerea în urmă (la nivelul anilor '70-'80) a spectroscopiei de fotoluminescenţă din UV-VIS, faţă de cea de absorbţie, am putea enumera următoarele:

- lipsa unor surse de radiaţii excitatoare de mare intensitate şi foarte stabile;
- lipsa unor receptori foarte sensibili;
- necunoaşterea tuturor factorilor ce pot influenţa spectrele de fotoluminescenţă;
- lipsa unor sisteme de prelucrare rapidă a spectrelor etc.

În ultimul timp (mai ales în ultimele două decenii) aceste deficienţe au fost, în mare parte, înlăturate încât putem spune că în ţările înaintate spectroscopia de fotoluminescenţă din UV-VIS a "trecut" înaintea spectroscopiei de absorbţie din acelaşi domeniu spectral. Oricum, aceste două metode de analiză spectrală trebuie utilizate în paralel (în situaţiile în care ele pot fi aplicate), deoarece se completează una pe alta.

Pentru efectuarea analizelor calitative pe baza spectrelor de absorbţie se pot utiliza următoarele date (sau mărimi caracteristice):

- forma şi poziţia benzii (în scara numerelor de undă, de exemplu),
- intensitatea acesteia,
- modificările pe care le poate suferi banda de absorbţie sub influenţa diverşilor factori cum ar fi: natura solventului, pH-ul soluţiei,

temperatura, iradierea etc.

Cu toate că anumitor grupări cromofore din moleculă li se pot atribui benzi de absorbție proprii, totuși poziția acestor benzi în spectru, intensitatea și chiar structura lor pot fi mult influențate de constituția restului moleculei. În plus, două substanțe organice a căror structură diferă puțin una de alta pot prezenta spectre în UV-VIS practic identice. Ținând seama de acestea cât și de faptul că spectrele de absorbție din UV-VIS prezintă de obicei benzi largi, cu puține maxime de absorbție, rezultă că aceste spectre sunt mai puțin caracteristice pentru structura compusului cercetat decât spectrele IR și ca atare se utilizează mai rar drept criteriu de identificare a substanțelor (de stabilire a structurii moleculare).

Analiza calitativă moleculară cu ajutorul spectrelor de absorbție din UV-VIS se poate efectua, în general, numai atunci când pentru un domeniu spectral relativ larg există o singură specie moleculară absorbantă în proba de analizat (cazul, de exemplu, al soluției unui singur component într-un solvent transparent). Identificarea moleculei absorbante se bazează pe compararea curbei de absorbție a probei cu curbele din cataloagele de spectre și are deci un caracter pur empiric.

Identificarea nu este însă certă, conform celor de mai sus. Putem avea certitudine doar dacă, sub acțiunea factorilor pomeniți mai sus, banda de absorbție a substanței studiate suferă aceleași modificări ca și ale substanței bănuite (deci trebuie trasate un șir de spectre de absorbție).

Unele amestecuri de substanțe, a căror spectre de absorbție se suprapun, pot fi analizate dacă se apelează la o serie de metode fizico-chimice de separare cum ar fi: extracția cu solvenți, transformarea chimică a unor componente în substanțe transparente, distilarea fracționată, separarea cromatografică etc.

Pentru efectuarea analizelor calitative pe baza spectrelor de fotoluminescență pe lângă mărimile similare spectrelor de absorbție se mai pot utiliza și mărimile:

- randamentul cuantic al fluorescenței și randamentul cuantic al fosforescenței (pe care le vom defini mai jos).
- timpul de viață al stărilor excitate de singlet și de triplet,
- gradul de polarizare al radiațiilor de fluorescență și fosforescență.

Problemele care se pun la efectuarea analizelor calitative sunt

cam aceleaşi ca şi în cazul utilizării spectrelor de absorbţie. Spre deosebire de aceste spectre (care sunt constituite din mai multe benzi) cele de fotoluminescenţă sunt mai simple, ele fiind constituite dintr-o singură bandă de fluorescenţă şi o singură bandă de fosforescenţă.

În cazul concentraţiilor foarte mici ale substanţei fluorescente de analizat, în locul spectrului de absorbţie se poate utiliza spectrul de excitare al fluorescenţei (vezi mai jos) care de obicei coincide cu cel de absorbţie.

Sensibilitatea analizei utilizând spectrele de fluorescenţă creşte pe măsură ce scade temperatura soluţiilor în care caz creşte atât intensitatea fluorescenţei (din cauză că se reduce numărul şi "intensitatea" ciocnirilor dintre molecule) cât şi gradul de structurare al benzilor (dacă ele nu sunt continue) în sensul că benzile de vibraţie devin mai înguste şi mai clar evidenţiate - vezi fig. 9. (Trebuie specificat că la temperatura camerei solvenţii polari determină de obicei o "ştergere" a structurii de vibraţie pe când cei nepolari determină o evidenţiere a acestei structuri)

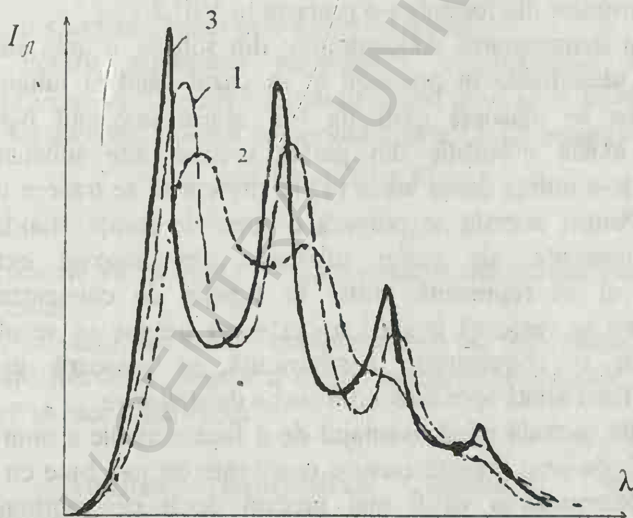


Fig. 9. Forma caracteristică a spectrelor de fluorescenţă ale unor compuşi aromatici plani. 1: solvent nepolar la temperatura camerei, 2: solvent polar la temperatura camerei, 3: solvent nepolar sau solvent polar la temperaturi scăzute, sub -150°C. (Am prezentat cazul general când spectrele suferă şi deplasări sub influenţa solventului şi a temperaturii.)

La scăderea temperaturii soluțiilor spectrele de absorbție suferă şi ele modificări similare cu a celor de fluorescență, mai mult în ce priveşte structurarea benzilor şi mult mai puțin în ce priveşte "intensitatea" lor (în ordonată luându-se extincția).

IX.4. Considerații privind analiza cantitativă ce utilizează spectrele electronice din UV-VIS.

IX.4.1. Analiza cantitativă utilizând spectrele de absorbție.

Principiile generale ale analizei cantitative bazate pe spectrele electronice de absorbție din UV-VIS sunt aceleaşi ca şi în cazul utilizării spectrelor IR de absorbție, deoarece în ambele cazuri se foloseşte legea lui Lambert-Beer:

(1) $$I^{(\nu)} = I_0^{(\nu)} 10^{-\varepsilon_\nu c l}; \; E^{(\nu)} = \varepsilon_\nu c l,$$

semnificația mărimilor din formule s-a precizat în VIII.3.

Pentru determinarea concentrației, din soluție, a unei substanțe cunoscute sau identificate în prealabil şi în cazul când la lungimea de undă λ la care se măsoară extincția (de obicei maximul benzii de absorbție) nu există absorbție din partea vreunei alte substanțe din soluție, în loc de-a utiliza direct legea (1) se preferă să se traseze o curbă de etalonare. Pentru aceasta se prepară o serie de soluții standard, de concentrații cunoscute, ale acelei substanțe. Se măsoară extincțiile acestor soluții şi se reprezintă grafic în funcție de concentrație. În condițiile în care se respectă legea Lambert-Beer trebuie să se obțină o dreaptă. Pentru o concentrație necunoscută se măsoară extincția, concentrația sa fiind aflată apoi direct din curba de etalonare.

Această metodă oferă avantajul de a face o medie a unui număr de valori obținându-se o dreaptă care se potriveşte cel mai bine cu datele. În acest fel determinarea va fi mai precisă decât cea obținută prin utilizarea unei singure valori a extincției.

Datorită faptului că extincțiile sunt aditive există adeseori posibilitatea de-a determina cantitatea fiecărui component dintr-un amestec, chiar dacă spectrele lor de absorbție se suprapun (se impune cunoaşterea acelor componente, mai exact cunoaşterea spectrelor lor de

absorbţie).

În fig. 10 sunt prezentate spectrele a şi b a doi componenţi

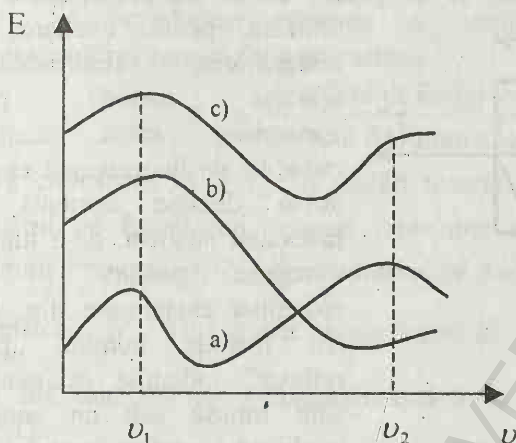


Fig. 10. a), b): spectrele electronice ale doi compuşi ipotetici, c) spectrul electronic obţinut prin amestecarea lor

ipotetici şi spectrul obţinut prin amestecarea lor.

Pentru rezolvarea matematică a problemei se aleg două frecvenţe ν_1 şi ν_2. Deoarece extincţia totală la ν_1 şi ν_2 se datorează sumei extincţiilor datorate ambilor componenţi se pot scrie ecuaţiile:

$$E^{\nu_1} = \varepsilon^1_{\nu_1} c_1 l + \varepsilon^2_{\nu_1} c_2 l ,$$

$$E^{\nu_2} = \varepsilon^1_{\nu_2} c_1 l + \varepsilon^2_{\nu_2} c_2 l .$$

Necunoscutele vor fi c_1 şi c_2, toate celelalte mărimi putând fi determinate experimental.

În cazul mai multor componenţi se fac măsurători de extincţie la mai multe frecvenţe, pentru a obţine numărul necesar de ecuaţii a căror rezolvare se face relativ uşor.

IX.4.2. Analiza cantitativă utilizând spectrele de fotoluminescenţă.

Analiza cantitativă ce utilizează spectrele de fotoluminescenţă se bazează pe legătura (dependenţa) dintre intensitatea fotoluminescenţei şi concentraţia solvitului. Să găsim această dependenţă în cazul fluorescenţei. Să presupunem că excităm fluorescenţa cu radiaţii

monocromatice de frecvență ν şi de intensitate I_0^ν.

Fie l grosimea cuvei (a stratului de soluţie) şi să neglijăm absorbţia produsă de solvent şi de pereţii cuvei. Să presupunem că utilizăm, pentru excitarea şi înregistrarea fluorescenţei, aşa-zisa metodă prin transmisie, adică captăm radiaţiile de fluorescenţă emise într-o direcţie normală la fasciculul incident, de-a lungul întregului parcurs (l) al radiaţiilor excitatoare (fig. 11) (În metoda numită „prin reflexie" radiaţiile excitatoare sunt trimise sub un anumit unghi pe suprafaţa stratului de soluţie, şi sunt captate radiaţiile de fluorescenţă „reflectate". Desigur că unghiul „de reflexie" trebuie să difere de cel de incidenţă pentru a nu se capta şi radiaţiile excitatoare reflectate de peretele cuvei. Metoda prin reflexie se utilizează, cu unele precauţii, mai ales în cazul concentraţiilor mai mari ale solvitului şi la temperaturi joase când solventul devine opac prin îngheţare).

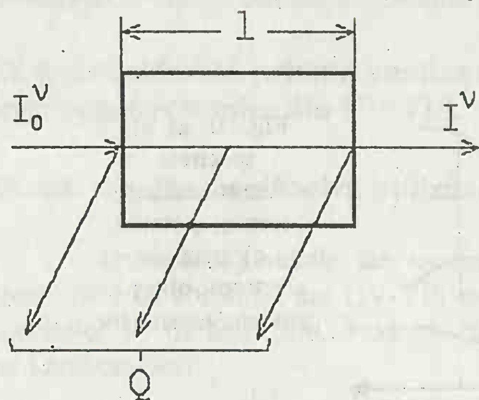


Fig. 11. Obţinerea fluorescenţei utilizând metoda „prin transmisie".

Conform legii Lambert vom avea:

$$I^\nu = I_0^\nu e^{-k_\nu l},$$

k_ν fiind coeficientul de absorbţie.

Intensitatea radiaţiilor absorbite va fi:

(2) $$I_a^\nu = I_0^\nu - I^\nu = I_0^\nu(1 - e^{-k_\nu l}).$$

Sub acţiunea acestor radiaţii (fotoni) se va emite întreg spectrul de fluorescenţă. Intensitatea totală a radiaţiilor de fluorescenţă, Q, se defineşte prin relaţia:

$$Q = \int_0^\infty I_F^\nu d\nu,$$

I_F^ν fiind intensitatea radiaţiilor de frecvenţă ν, din spectrul de

fluorescență. Conform definiției, Q este proporțională cu aria benzii de fluorescență, în cazul când această bandă este trasată în scara frecvențelor.

Să introducem mărimea φ_F, numită randament cuantic al fluorescenței şi care se defineşte astfel:

$$\varphi_F = \frac{\text{numărul de fotoni emişi}}{\text{numărul de fotoni absorbiţi}}.$$

Dacă exprimăm Q şi I_a^ν în unități numite einsteini, care ne indică şi numărul de fotoni (un einstein reprezintă energia a N_A fotoni de o anumită frecvență υ, N_A fiind numărul lui Avogadro, adică :

1 einstein $= N_A \cdot h\nu$) atunci putem scrie: $\varphi_F = \frac{Q}{I_a^\nu}$. Mărimea φ_F definită mai sus este de fapt o caracteristică a moleculelor substanței solvite (φ_F<1).

Dacă ținem seama de relația (2), Q se poate scrie sub forma:

$$Q = \varphi_F I_a^\nu = \varphi_F I_0^\nu \left(1 - e^{-k_\nu l}\right).$$

Dezvoltând exponențiala în serie se obține:

$$Q = \varphi_F I_0^\nu \left[k_\nu l - \frac{(k_\nu l)^2}{2} + \frac{(k_\nu l)^3}{6} - \dots \right].$$

Având în vedere că: $k_\nu = 2{,}3\varepsilon_\nu c$ (relație ce exprimă legătura dintre dependența $I^{(\nu)} = I_0^{(\nu)} e^{-k_\nu l}$ şi $I^{(\nu)} = I_0^{(\nu)} 10^{-\varepsilon_\nu cl}$), se obține:

$$Q = \varphi_F I_0^\nu 2{,}3\varepsilon_\nu cl \left[1 - \frac{2{,}3\varepsilon_\nu cl}{2} + \frac{(2{,}3\varepsilon_\nu cl)^3}{6} - \dots \right].$$

În cazul soluțiilor diluate, slab absorbante, $\varepsilon_\nu cl$ este mic astfel că se poate scrie:

(3) $$Q = \varphi_F I_0^\nu (2{,}3\varepsilon_\nu cl) = 2{,}3\varphi_F I_0^\nu E^\nu.$$

Conform ultimei relații intensitatea totală a radiațiilor de fluorescență (sau intensitatea pentru orice frecvență din banda de fluorescență, de exemplu pentru frecvența maximului benzii) este proporțională cu concentrația soluției (cu condiția ca aceasta să fie mică)

şi cu intensitatea I_0^{ν} a radiaţiilor excitatoare. Ultimul fapt este deosebit de important pentru analiza cantitativă deoarece arată că sensibilitatea analizei creşte pe măsură ce creşte intensitatea (şi puterea) sursei spectrale utilizate la excitare. Din acest motiv s-au creat lămpi cu mercur şi xenon de mare putere şi intensitate, iar în ultimii ani cele mai utilizate surse de excitare sunt laserii.

Conform relaţiei (3) dacă se iluminează soluţia diluată a unei substanţe cu radiaţii excitatoare de diferite frecvenţe $\nu_1, \nu_2, \ldots$(cuprinse în banda de absorbţie) astfel încât $I_0^{\nu_1} = I_0^{\nu_2} = \ldots =$const., atunci Q va urmări variaţia extincţiei E^{ν}. Pentru simplitate în loc de Q se măsoară intensitatea unei radiaţii de o anumită frecvenţă din banda de fluorescenţă, frecvenţă ce a primit denumirea de frecvenţă de analiză (ν_a). (Ceea ce se măsoară de fapt nu este I^{υ_a} ci $I^{\upsilon_a} \Delta\upsilon^{\upsilon_a}$, $\Delta\upsilon^{\upsilon_a}$ fiind lărgimea benzii de transmisie a monocromatorului de analiză pentru frecvenţa υ_a, vezi VIII.5).

Dependenţa intensităţii fluorescenţei, pentru o anumită frecvenţa de analiză ν_a, de frecvenţa radiaţiilor excitatoare a primit denumirea de spectru de excitare al fluorescenţei, el fiind identic, ca formă, cu cel de absorbţie. Deosebirea faţă de acesta constă în faptul că nu se înregistrează extincţia ci o mărime proporţională cu ea.

Relaţia (3) poate fi utilizată şi pentru exprimarea intensităţii totale a radiaţiilor de fosforescenţă (de asemenea în cazul soluţiilor diluate) cu deosebirea că în loc de φ_F trebuie luat φ_P, randamentul cuantic al fosforescenţei.

Concentraţia c a unui compus din soluţia de analizat (în cazul când banda lui de fluorescenţă sau fosforescenţă nu se suprapune cu banda altui compus aflat în soluţie) nu se poate determina apelând direct la relaţia (3). Aceasta deoarece e dificil să se măsoare Q şi I_0^{ν} în unităţi absolute. Din acest motiv se trasează în prealabil un grafic de etalonare luând în ordonată sau Q sau intensitatea fluorescenţei pentru o anumită frecvenţă, în unităţi relative, iar în abscisă concentraţia.

În cazul efectuării analizelor cantitative utilizând spectrele de fluorescenţă (sau, mai rar, cele de fosforescenţă) trebuie avut în vedere şi procesele ce duc la „stingerea" (micşorarea intensităţii) acestor spectre.

Efectele „stingătoare” pot avea în primul rând diverse impurități din solvent, dacă acesta nu este de un înalt grad de impuritate, condiție ce trebuie să o îndeplinească un solvent pentru spectroscopia de fluorescență moleculară.

Dacă se dispune de un solvent având un grad de puritate mai scăzut (pur, purissim, p.a. etc) acesta trebuie obligatoriu distilat şi să i se controleze absorbţia şi fluorescenţa. Chiar dacă aceste controale nu indică impurităţi „observabile” se recomandă să se utilizeze acelaşi solvent (din aceeaşi sticlă) atât pentru trasarea dreptei de etalonare cât şi pentru dizolvarea probei de analizat.

Efecte stingătoare pot avea uneori chiar solvenţii puri, mai ales cei ce conţin atomi de halogen (cum ar fi cloroformul), de asemenea şi oxigenul dizolvat în solvent. Oxigenul dizolvat stinge mai ales fosforescenţa.

O metodă simplă de-a îndepărta oxigenul din soluţie constă în barbotarea acesteia cu argon sau azot. Nu se barbotează solventul înainte de a face soluţia căci, în timpul turnării acestuia, „captează” oxigen din aer.

Datorită faptului că şi intensităţile fotoluminescenţei (a fluorescenţei, dacă se lucrează la temperatura camerei) sunt aditive se pot efectua, cu anumite precauţii, analize cantitative “multicomponent” după principiul descris în cazul utilizării spectrelor de absorbţie. Precauţiile trebuie să ţină în primul rând seama de faptul că diverse impurităţi din soluţie, printre care şi oxigenul dizolvat în solvent, de multe ori chiar solventul, pot avea efecte “stingătoare” (de micşorare a intensităţii fluorescenţei) diferite, în funcţie de natura solvitului. Pe de altă parte şi diversele substanţe ale probei de analizat pot avea, una asupra alteia, anumite efecte stingătoare (interferenţe). Toate aceste efecte trebuie cunoscute înainte de efectuarea analizei.

IX.5. Analiza unor substanțe plecând de la complecșii acestora cu diverși reactivi.

IX.5.1. Analiza unor ioni metalici.

Determinarea ionilor metalici aflați în diverse soluții (apă, ser etc), chiar și în cantități infime, se bazează pe faptul că prin combinarea acestora cu un reactiv (ligand) adecvat pot rezulta complecși (chelați) ce prezintă, în domeniul UV-VIS, o absorbție puternică, uneori și o fluorescență intensă. Liganții fiind compuși organici vorbim de complecși organo-metalici.

Prezența benzilor electronice intense la complecșii organo-metalici se explică prin transferul de sarcină între ligand și ionul metalic. În mod normal tranziția are loc atunci când ionul metalic este redus și ligandul este oxidat. Se poate observa însă și fenomenul invers, atunci când un ion metalic aflat într-o stare de oxidare scăzută este complexat cu un ligand având o mare afinitate pentru electroni cum ar fi complexul Fe (II) - fenantrolină.

Agentul de complexare trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

- reacția de complexare trebuie să fie completă și stoechiometrică,
- complexul trebuie să fie stabil,
- complexul trebuie să absoarbă în domeniul ultraviolet sau vizibil,
- spectrul de absorbție și de fluorescență al complexului să nu se suprapună cu spectrele similare ale ligandului.

Prin convertirea unui ion metalic într-un complex mai rezultă două avantaje importante pentru analiză. Un anumit agent de chelatizare va reacționa numai cu câtiva ioni metalici, ceea ce conferă selectivitate. Pe de altă parte, chiar dacă unii ioni metalici formează complecși cu același reactiv, caracteristicile de absorbție și fluorescență pot diferi destul de mult, pentru a permite determinarea unui anumit ion metalic în prezența altora.

În tabelul 1 se prezintă unii din agenții de complexare care sunt utilizați în analiza spectrofotometrică a ionilor metalici. Dintre acești reactivi pot fi utilizați pentru analize fluorometrice doar aceia ale căror

molecule conţin două sau mai multe inele benzenice.

Tabel 1. Reactivi tipici utilizaţi în analizele spectrofotometrice şi fluorometrice.

Reactivul	Structura	Ionul analizat[a)]
1,10-Fenantrolină	N N	Fe (II)
2,9-Dimetil-1,10-fenantrolină	N N H_3C CH_3	Cu (I)
Acid sulfosalicilic	CO_2H OH HO_3S $SO_3^-Na^+$	Al (III), Ti (IV)
Tiouree	S $H_2N-C-NH_2$	Bi (III), Os
Sare nitrozo R	NO OH $Na^+O_3S^-$ $SO_3^-Na^+$	Co (II)
8-Hidroxichinolină	N OH	Zn (II), Al (III), Ce (III), Ga (III), In (III), Mg (II), Sc (III) şi alţii
Ditizonă	S N=N-C-NH-NH	Pb (II), Hg (II), Zn (II), Bi (III)
Benzoin α-oximă	HO N-OH C-C	Cu (II), Mo (V)
Ditiooxamidă	S S $H_2N-C-C-NH_2$	Ni (II), Co (II), Cu (II), Bi (III)

Tabel 1, continuare.

1-Nitrozo-2-naftol	NO, OH	Co (II)
Rodamină B	$(C_2H_5)_2N$, O, $\overset{(+)}{N}(C_2H_5)_2$ $Cl^{(-)}$, CO_2H	Sb (V)
Dietilditiocarbamat de sodiu	C_2H_5, C_2H_5, N–C, S, $S^{(-)}$ $Na^{(+)} \cdot 3H_2O$	Cu (II)
Chinalizarină	HO, O, OH, OH, HO, O	B
Toluen-3, 4-ditiol	SH, SH, CH_3	Sn (IV), Mo (V), W (VI)
2,4-Xilenol	OH, CH_3, CH_3	NO_3
Toron	OH, HO, $SO_3^-NA^+$, –N=N–, $SO_3^-NA^+$	Th (IV), Zr (IV)
Dimetilglioximă	HO, OH, N, N, $H_3C-C-C-CH_3$	Ni (II)

Tabel 1, continuare.

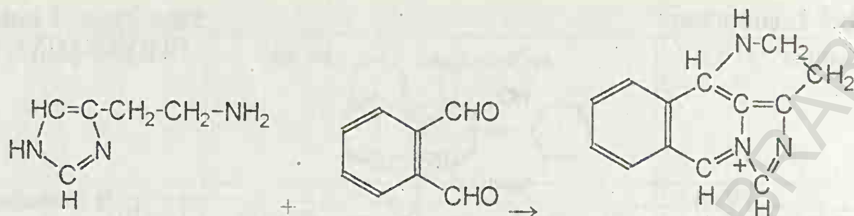
Arsenazo	$NA^+O_3S^-$ … $SO_3^-Na^+$ … N=N … HO OH … $AsO_3H^-Na^+$	Hf (IV), Zr (IV)
Acetilacetonă	$CH_3C(=O)CH_2C(=O)CH_3$	Be (III)
2,2',2''-Terpirină	N N N	Co (II)
Dibenzoilmetan	$C_6H_5-C(=O)-CH_2-C(=O)-C_6H_5$	UO_2 (II)

[b] Ioni analizați mai frecvent cu reactivul respectiv. Dacă este înregistrat numai un ion trebuie luat în considerare faptul că reactivul este specific numai pentru acest ion.

IX.5.2. Analiza unor compuși ce nu prezintă benzi de absorbție și fluorescență în domeniul vizibil și ultraviolet apropiat, sau aceste benzi au o intensitate mică.

Este des utilizată proprietatea chelaților de a avea o absorbție și fluorescență intensă în UV-VIS. Pentru aceasta compusul de analizat este transformat într-un chelat, în urma reacției cu o sare a unui anumit metal. Ca exemple se pot da chelații: proteine - Cu (II) (vezi X.6.1.) și anhidrotetraciclina - Al (III) (vezi X.6.3.).

O altă metodă de a transforma un compus organic nefluorescent (sau slab fluorescent) într-unul cu o fluorescență intensă este de a-l combina cu un reactiv potrivit ales. Astfel, pentru determinarea histidinei și a imidazolilor înrudiți se utilizează ca reactiv de complexare o-ftalaldehida. Reacția histaminei cu acest reactiv este următoarea:



Pe baza fluorescenței compusului obținut (vezi și IX.6.4.) se poate determina histamina din țesuturi și sânge.

Pentru determinări de urme de sînge (în criminalistică, de exemplu) se utilizează frecvent două metode. Una din ele se bazează pe reacția dintre hemoglobină și hidrazida acidului 3-amoniftalic (luminolul), în prezența H_2O_2, ce dă un compus puternic fluorescent. O altă metodă se bazează pe obținerea hematoporfirinei, având o fluorescență intensă, dacă urmele de sânge sunt tratate cu acid sulfuric concentrat.

Determinarea diglucozidatei-malvodiza (malvina) din vinuri (compusul respectiv există în vinurile hibride) se face tratând mostra de vin cu acid azotic rezultând malvona care, dizolvată în amoniac, prezintă fluorescență. Pe baza acestei fluorescențe se poate controla faptul dacă vinurile nobile sunt amestecate cu vin hibrid.

Deoarece complexul format între substanța de determinat și ligant reprezintă de fapt o singură specie care absoarbe sau emite, toate considerațiile privind analiza calitativă și cantitativă făcute în IX.3. și IX.4. sunt valabile și în acest caz.

IX.6. Obținerea și înregistrarea spectrelor electronice din domeniul ultraviolet și vizibil (UV-VIS).

Dispozitivele pentru obținerea și înregistrarea spectrelor de absorbție se numesc spectrofotometre, cele pentru spectrele de fluorescență se numesc spectrofluorimetre iar cele pentru spectrele de fosforescență și fluorescență întârziată se numesc spectrofosforimetre.

Un spectrofotometru pentru UV-VIS are același principiu de funcționare ca și un spectrofotometru pentru IR (vezi VIII.4).

Diferențele dintre cele două tipuri de aparate se referă în principal la:

- optica utilizată; materialul prismelor şi a diferitelor piese optice prin care trece lumina trebuie să fie din cuarț, care este transparent atât în UV cât şi în VIS,
- sursa de radiații excitatoare; pentru UV-VIS se utilizează două surse – una pentru UV, de obicei o lampă cu deuteriu sau hidrogen, şi alta pentru VIS – o lampă cu incandescență obişnuită (bec),
- receptorul de radiații; se utilizează fie celule fotoelectrice fie fotomultiplicatori,
- măsurarea intensității radiațiilor, I respectiv I_0, se face tot printr-o metodă de zero însă in loc de "nulul" optic se utilizează "nulul" electric.

În fig.14 se prezintă schema optică a spectrofotometrului VSU-1, cu un singur fascicul, utilizat mai ales pentru efectuări de analize cantitative, când citirile extincțiilor se fac la anumite lungimi de undă.

Un spectrofluorimetru obişnuit (şi mai ieftin) e mai simplu decât un spectrofotometru, schema lui de principiu fiind cea din fig. 12, unde:

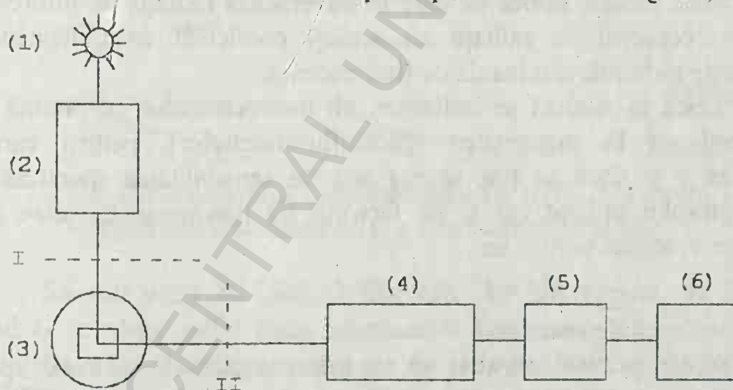


Fig 12. Schema de principiu a unui spectrofluorimetru - fără componentele I şi II (prin adăugarea acestora instalația devine un spectrofosforimetru - vezi mai jos).

(1): sursă de excitare-lampă cu xenon,(2): monocromator de excitare, (3): cuva cu soluție plasată într-un criostat,(4): monocromator de analiză, (5): fotodetector (fotomultiplicator, fotodiode etc.),(6): înregistrator, cuplat de obicei cu un amplificator de curent continuu (pentru curentul dat de fotomultiplicator).

Spectrul obţinut cu o astfel de instalaţie simplă (cum avem şi în laborator) nu este cel real. Precizăm că spectrul de fluorescenţă real este dependenţa mărimii I_F^ν de frecvenţa radiaţiilor (sau a mărimii I_F^λ de lungimea de undă). Această mărime se defineşte astfel:

$$I_F^\nu = \frac{dQ}{d\nu} = \frac{\Delta Q}{\Delta \nu},$$

semnificaţia lui Q s-a precizat în IX.4.1.

Experimental se măsoară şi se înregistrează ΔQ pentru diferite frecvenţe (sau lungimi de undă) obţinându-se aşa numitul spectru măsurat (ΔQ exprimându-se în unităţi relative). Spectrul de fluorescenţă măsurat ar coincide cu cel real doar în următoarele situaţii:

- receptorul de radiaţii este neutru, în care caz semnalul obţinut de la acesta depinde doar de energia radiaţiilor nu şi de frecvenţa lor,
- monocromatorul de analiză are, ca sistem dispersiv, o reţea de difracţie, pentru care Δν (semilărgimea benzii transmise) nu depinde de frecvenţă, adică Δν =const.,
- toate piesele optice pe care le traversează radiaţia de fluorescenţă până la receptorul de radiaţii au acelaşi coeficient de transmisie (L) pentru toate radiaţiile din banda de fluorescenţă.

Dacă la analiză se utilizează un monocromator cu prismă (cum se procedează la majoritatea spectrofluorimetrelor), pentru care Δν variază cu ν şi dacă se ţine seama atât de sensibilitatea spectrală P_ν a fotoreceptorului utilizat cât şi de factorul de transmisie L_ν, care şi ele variază cu ν, atunci vom avea:

$$\Delta Q \approx I_F^\nu \cdot \Delta\nu \cdot P_\nu \cdot L_\nu = I_F^\nu \cdot S_\nu,$$

unde: S_ν =factor de corecţie.

Adică spectrul măsurat nu va mai coincide cu cel real. Spectrul real de fluorescenţă se va obţine corectând spectrul măsurat, împărţind diversele valori ΔQ la factorul de corecţie S_ν.

Nici spectrul de excitare al fluorescenţei, obţinut cu o instalaţie ca cea de mai sus, nu va fi cel real deoarece intensităţile : $I_0^{\nu_1}, I_0^{\nu_2}, I_0^{\nu_3}, \ldots$ ale radiaţiilor cu care se excită fluorescenţa diferă între ele din două motive:

- lampa utilizată la excitare are de obicei un astfel de spectru (continuu) încât intensitatea variază cu frecvenţa,

- coeficientul de transmisie L_{ν} al monocromatorului de excitare variază şi el cu ν.

Spectrofluorimetrele moderne permit corectarea automată a ambelor tipuri de spectre.

Un spectrofosforimetru obişnuit are în plus, faţă de spectrofluorimetrul descris, un dispozitiv format din două întrerupătoare (obturatoare) mecanice sau optice (utilizând, de exemplu, efectul Keer), ce acţionează periodic, având rolul de modulatoare de intensitate.

Unul din obturatoare (I, fig. 12) modulează intensitatea radiaţiei excitatoare, lăsând-o să cadă pe probă doar în intervalele de timp t_1 şi o obturează pe intervalele de timp t_2 (fig. 13a).

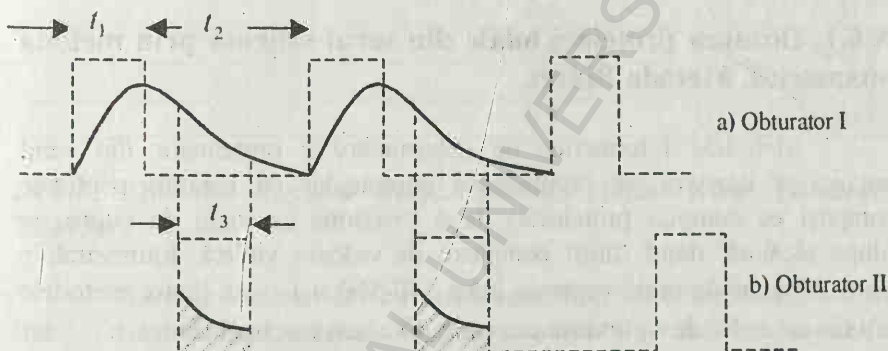


Fig. 13. Explicarea rolului obturatoarelor I si II (fig. 12) pentru înregistrarea fosforescenţei şi a fluorescenţei întârziate.

Se utilizează de obicei frecvenţa de întrerupere de 800 Hz. Timpul t_1 se alege astfel încât intensitatea fosforescenţei să ajungă la o valoare staţionară. Curba punctată din fig. 13 a) arată variaţia periodică a intensităţii luminii excitatoare ce cade pe probă. Această curbă va caracteriza de asemenea şi variaţia intensităţii fluorescenţei obişnuite (prompte) cu timpul. (Faţă de mărimea intervalului t_1, de ordinul a 10^{-3}s, intensitatea maximă a fluorescenţei prompte se atinge practic instantaneu la deschiderea obturatorului I şi se stinge la fel de repede la "închiderea" lui). Curba continuă din fig. 13 a) arată creşterea şi stingerea (descreşterea) fotoluminescenţei de viaţă lungă în timpul cât I este deschis şi închis.

Cel de al doilea obturator, II (fig 12), modulează intensitatea radiației de luminescență ce cade pe fotodetector; de obicei intervalul de timp t_3, când acest obturator este deschis, se ia ceva mai mare decât t_1, frecvența de modulare fiind aceeași ca la întrerupătorul I. În fig. 13 b) se prezintă situația când obturatorul II este defazat față de obturatorul I. În acest caz pe fotodetector cad numai radiații corespunzătoare fotoluminescenței de viață lungă, respectiv cele de fluorescență întârziată și fosforescență. Intensitatea totală a acestor radiații, pe durata t_3, va fi aria hașurată.

IX.6. Probleme practice de laborator.

IX.6.1. Dozarea proteinei totale din serul sanguin prin metoda fotometrică. Metoda Biuret.

Metodele fotometrice de determinare a proteinelor din serul sanguin se bazează pe proprietățile compușilor cu legături peptidice (compuși ce compun proteinele) de a reacționa cu ionul de cupru, în soluție alcalină, dând săruri complexe de culoare violetă, fotometrabile pentru lungimi de undă cuprinse între 540-560 $m\mu$. Una dintre metodele de a obține astfel de săruri este cea care utilizează reactivul Biuret.

Reactivul Biuret se poate prepara din următorii compuși:

- sulfat de cupru.......................1,5 g (dizolvate în 500 ml H_2O)
- tartat dublu de sodiu și potasiu (sare Seignette)....6 g (dizolvate în 200 ml H_2O)
- hidroxid de sodiu.................. 30g (dizolvate în 300ml H_2O)
- iodură de potasiu ....1 g
- apă până la..................... 1000 ml.

Modul de lucru : se pipetează în două eprubete:

	Soluția probă	Soluția martor
- probă (cu 1-10 mg proteină)	1 ml	
- apă	-	1 ml
- reactiv Biuret	4 ml	4 ml

Se agită și se lasă 30′ la temperatura camerei. Se citește apoi

extincţia la $\lambda = 546\,nm$, în cuva de 1cm. Concentraţia de proteine din probă se va citi din curba de etalonare obţinută cu proteină pură (albumină cristalizată). Datele necesare pentru trasarea curbei de etalonare sunt prezentate în tabelul de mai jos. Aceste date au fost obţinute plecând la o soluţie stoc ce conţine 10 mg proteină pură pe 1ml, măsurătorile făcându-se tot pentru $\lambda = 546\,nm$, utilizând cuva de 1cm.

Concentraţia albuminei, în mg/ml	ml din soluţia stoc	ml H_2O	E (extincţia)
10	1	-	0,515
8	0,8	0,2	0,410
6	0,6	0,4	0,315
4	0,4	0,6	0,215
2	0,2	0,8	0,110
1	0,1	0,9	0,055

IX.6.2. Dozarea fierului seric. Metoda fotometrică Helmeyer-Plaetner.

Sărurile feroase dau cu ortofenantrolina un complex roşu foarte stabil, format din trei molecule de ortofenantrolină pentru un atom de fier feros (Fe^{++}, Fe (II)).

Reactivi necesari:

- acid clorhidric 6N,
- acid tricloracetic 20%,
- paranitrofenol 1% în alcool de 96^0,
- amoniac 20%,
- acid sulfuric 0,5N,
- hidrochinonă 2% (se face în ziua întrebuinţării),
- clorhidrat de ortofenantrolină 1% în apă distilată, acidulată cu 2-3 picături de acid sulfuric,
- soluţie stoc: alaun feriamoniacal 0,0863g, $[FeNH_4(SO_4)_2 \cdot 12H_2O]$ dizolvat în 500 ml HCl 6N

Din soluţia stoc se face o diluţie 1%: 1ml=2 μg Fe. Soluţia serveşte la construirea curbei etalon, care se efectuează cu cel puţin 3

diluții ale acesstei soluții.

Modul de lucru:

	Probă	Martor
Ser	2 ml	-
Acid clorhidric 6N	1 ml	-
Agitarea, 10 minute repaus		
Acid tricloracetic 20%	2 ml	-
Agitare, 10 minute repaus. Filtrare sau centrifugare		
Filtrat	2,5 ml	-
Apă	-	2,5 ml
p-nitrofenol	0,05 ml	0,05 ml
Amoniac până la neutralizare=culoarea galbenă		
Acid sulfuric 0,5N până la dispariția culorii galbene		
Hidrochinonă	0,5 ml	0,5 ml
Ortofenetrolină	0,5 ml	0,5 ml
Apă până la 5 ml volum final		

După 10 minute se citeşte extincția probei față de martor la $\lambda = 510 \mu m$ apoi concentrația fierului din probă se scoate din curba de etalonare.

Valori normale pentru concentrația fierului din ser sunt :

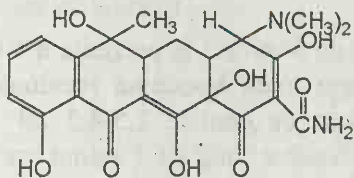
- pentru femei: 90-100 μg Fe la 100 ml ser,
- pentru bărbați 130-140 μg Fe la 100 ml ser.

IX.6.3. Determinarea tetraciclinei din serul sanguin prin metoda fluorometrică.

Tetraciclina (I), un antibiotic des utilizat, poate fi determinată prin metode fluorometrice după ce este transformată în anhidrotetraciclină (II) şi apoi complexată cu aluminiul.

Procedeul de lucru este următorul. Din sistemul metabolic se extrag 0,2 ml de ser, se adaugă 9 ml de apă şi 1ml acid tricloracetic 30%, apoi soluția se amestecă şi se centrifughează. Se iau 8 ml filtrat, se adaugă 1ml acid clorhidric 5M şi fierbe soluția timp de 30 minute. După ce soluția este neutralizată cu o soluție de hidroxid de sodiu, se ajustează pH-ul cu ajutorul unei soluții tampon, la valoarea de 4,5 şi se adaugă apoi

2 ml de cloroform.





I II

Se ia 1ml din această soluţie şi se amestecă cu 1ml de $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ 0,1% în alcool etilic absolut, lăsându-se apoi soluţia liniştită timp de cel puţin o oră pentru a permite formarea complexului.

Concentraţia necunoscută urmează să fie determinată din dreapta de etalonare, construită pentru o serie de standarde date. Dependenţa liniară între intensitatea fluorescenţei (măsurată în unităţi relative) şi concentraţia tetraciclinei se obţine pentru domeniul de concentraţii 0,1-20 μg tetraciclină/ml probă.

Obs. Anhidrotetraciclina prezintă şi ea fluorescenţă dar randamentul cuantic al acesteia este de circa 30 de ori mai mic decât al complexului cu aluminiu. Astfel, formarea complexului oferă analizei o sensibilitate mult mai mare.

X.6.4. Determinarea fluorometrică a histaminei din ţesut prin metoda Shore.

În metoda Shore de determinare fluorometrică a histaminei se utilizează reacţia de complexare a acesteia cu o-ftalaldehida, din care rezultă un compus având o fluorescenţă intensă (vezi X.5). Această metodă permite detectarea unor cantităţi foarte mici de histamină – de ordinul a 10^{-3} μg /ml.

Un volum determinat de ţesut este omogenizat în 9 volume de acid percloric 0,4N, utilizând un dispozitiv de omogenizare. Omogenatul este lăsat în repaus un timp de 10 minute apoi este centrifugat. Se toarnă apoi o cantitate de 4 ml de lichid supernatant într-un balon cotat de 25ml, în care se găsesc 0,5 ml NaOH 5N, 1,5g NaCl şi 10 ml de n-butanol. Balonul este agitat timp de 10 minute pentru extragerea histaminei de

către m-butanol iar după centrifugare faza apoasă este recoltată prin aspirare.

Faza organică este agitată timp de 5 minute în prezența a 5 ml de NaOH 0,1N. Prin aceasta se va extrage toată histamina reziduală. Se transferă 8 ml de soluție într-o eprubetă ce conține 2,5-4,5 ml acid clorhidric 1N și 15 ml n-heptan. După agitare timp de 1 minut eprubeta este centrifugată și histamina în faza apoasă va servi la determinările fluorometrice. Pentru a putea face astfel de determinări extractul de histamină trebuie condensat cu 0-ftalaldehidă într-o soluție puternic alcalină pentru a se obține complexul fluorescent.

Determinarea cantitativă a histaminei se va face pregătind în prealabil soluțiile etalon conținând între 0,05 și 0,5 μg /ml histamină, de exemplu 4 soluții etalon. Pentru fiecare din aceste soluții trebuie obținut complexul cu o-ftalaldehida. Pentru aceasta se iau 2 ml soluție etalon și se transferă într-o eprubetă în care se adaugă 0,4 ml de NaOH 1N și 0,1 ml de 0-ftalaldehidă. După 4 minute se mai adaugă 0,2 HCl 3N. Soluția este stabilă cel puțin jumătate de oră, timp în care se poate măsura intensitatea fluorescenței în unități relative, fie pe maxim ($\lambda^{fl.}_{max}$ =4500 nm, $\lambda_{exc} = 360\,nm$) fie integrând banda de fluorescență.

Pentru concentrațiile de histamină între 0,05 și 0,5 μg /ml intensitatea fluorescenței complexului depinde liniar de concentrația histaminei.

Măsurând în final și intensitatea fluorescenței probei, în aceleași condiții în care s-au făcut măsurătorile pentru etaloane, concentrația necunoscută se va scoate din graficul de etalonare.

X.7. Schema optică a spectrofotometrului VSU-2P și cele mai importante reguli pentru lucrul la aparat.

Pentru măsurători de extincție la anumite lungimi de undă, măsurători necesare analizelor cantitative, se preferă utilizarea unui spectrofotometru cu un singur fascicul, cum este VSU-2P, precizia de citire a extincției fiind mai mare decât la aparatele similare cu două fascicule.

Schema optică simplificată a spectrofotometrului VSU-2P este prezentată în figura 14.

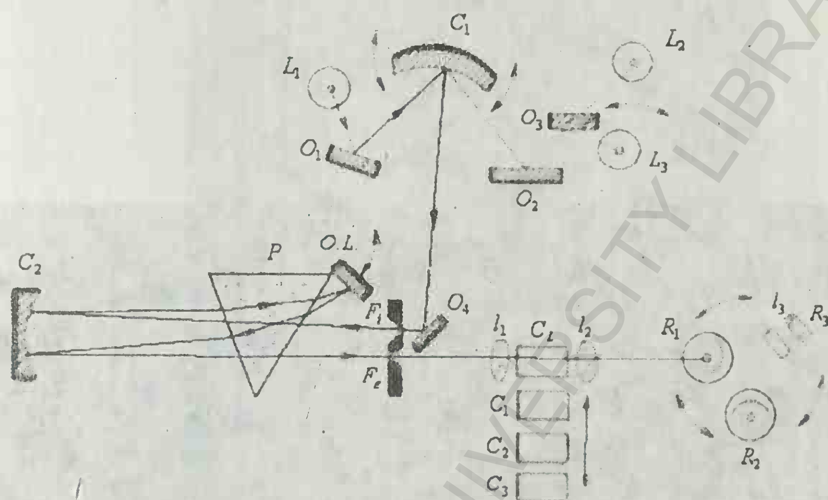


Fig. 14. Schema optică a spectrofotometrului VSU-2P.

L_1 : lampă cu deuteriu, pentru domeniul spectral 200-380 nm,

L_2 : lampă cu incandescenţă pentru domeniul 320-2700 nm,

L_3 : lampă cu vapori de mercur pentru verificarea etalonării scalei lungimilor de undă,

$O_1 ... O_4$ - oglinzi plane,

C_1, C_2 - oglinzi concave; C_1 - oglindă colimatoare; C_2 - oglindă de focalizare,

P - prismă , OL - oglinda Littrow,

F_i - fantă de intrare, F_e - fantă de ieşire,

l_1, l_2, l_3 - lentile de focalizare,

C_L - locaş cuvă pentru solvent,

$C_1 ... C_3$ - locaşuri pentru cuvele cu soluţii; R_1, R_2 : fotocelule,

R_3 : fotorezistenţă.

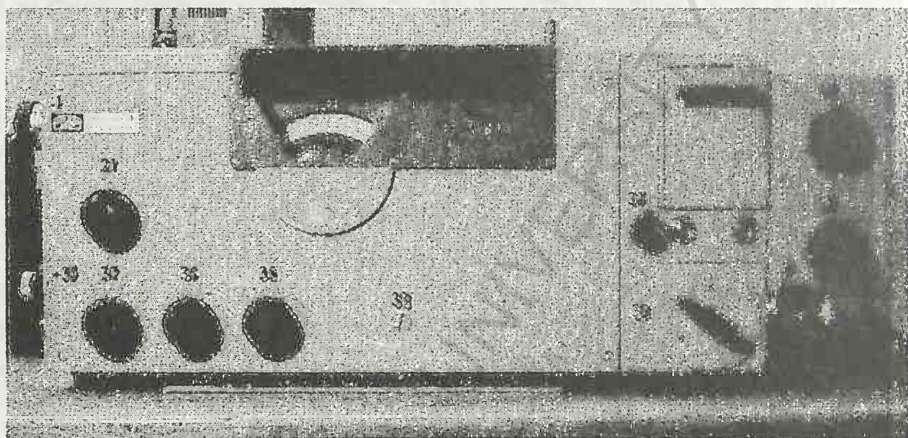


Fig. 15. Vederea din faţă a blocului cu componentele optice ale spectrofotometrului VSU-2P.

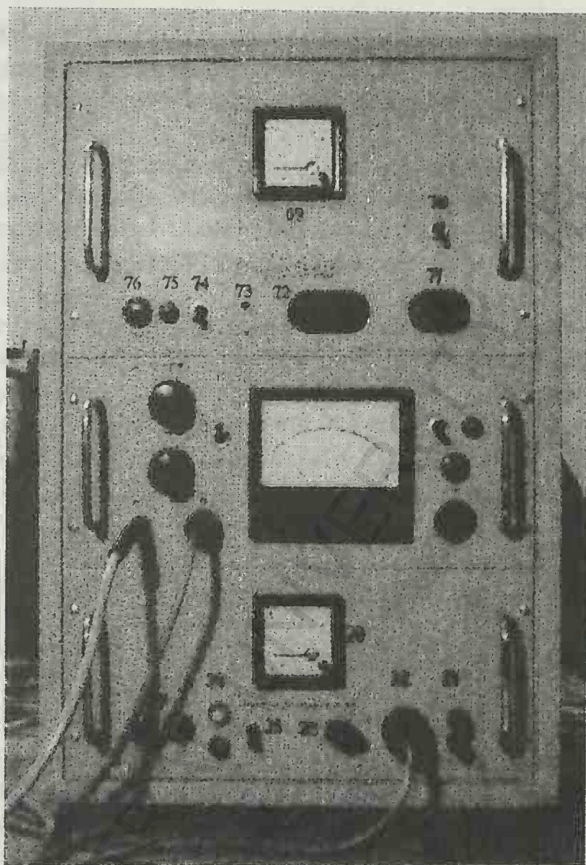


Fig. 16. Vederea din față a blocului cu circuitele electrice și electronice ale spectrofotometrului VSU-2P.

Rezumat al celor mai importante reguli de manipulare pentru utilizarea spectrofotometrului VSU-2P.

1. Pregătirea măsurătorii.

1.1. Declanșarea dispozitivului:

a) Comutatorul domeniilor de măsură (36) se pune pe poziția zero.
b) Rozeta gradată pentru reglarea fantei (1) se pune la zero.
c) Se închide comutatorul (74) pentru alimentarea de la rețea: poziția (1). Se așteaptă până se aprinde becul roșu (75) iar tabloul (69) să indice 300 mA (în dreptul punctului marcat cu roșu).

d) Lampa cu deuteriu (pentru domeniul spectral 200-380 nm) se cuplează cu comutatorul (70). Se aşteaptă 15 minute până când lampa cu deuteriu intră în regim normal. Schimbătorul lămpilor (31) se aduce în dreptul punctului albastru.

e) Lampa cu incandescenţă (pentru domeniul spectral 320 nm până în IR) se cuplează cu comutatorul (25) la stabilizatorul de tensiune 6V, 30W. Se aşteaptă până când se aprind becurile (26) iar curentul de la tabloul (20) să indice 5A. Schimbătorul lămpilor (31) se aduce în dreptul punctului roşu.

f) Pentru ambele lămpi se foloseşte fotocelula corespunzătoare cercului albastru - tambur (12), permiţând lucrul în domeniul spectral 200-650 nm.

1.2. Reglarea punctului de zero al amplificatorului.

a) Schimbătorul de probe (30) se pune pe D, M_1, M_2 sau M_3.

b) Comutatorul domeniilor de măsură (36) se pune pe I.

c) Cu reglorul punctului de zero (28) grosier se reglează spotul galvanometrului între firele scalei.

d) Comutatorul domeniilor de măsură se pune pe IV şi se reface cu butonul fin.

1.3. Reglarea punctului de zero al galvanometrului.

a) Schimbătorul de probe se pune pe poziţia L.

b) Deviaţia eventuală a galvanometrului ce apare la a) se compensează prin deplasarea şaibei de poziţie (5) a punctului de zero.
La deviaţii mari se reface 1.2. Aparatul fiind reglat se evită manipularea şaibei.

2. Procedeul de măsurare.

2.1. Introducerea probelor în cutia cuvelor.

a) Schimbătorul probelor se pune pe D.

b) Se scoate afară măsuţa cuvelor. Proba martor (solventul) se aşează în locaşul notat cu L iar probele de măsurat în locaşurile notate cu M_1, M_2, M_3. Atenţie la curăţirea, umplerea şi manipularea cuvelor: să nu se zgârie sau să se spargă, în special în cazul cuvelor din cuarţ.

c) Măsuţa cuvelor se introduce în cutia cuvelor şi aceasta se închide.

2.2. Egalizarea curentului de întuneric

a) Schimbătorul probelor (30) se pune pe D.

b) Schimbătorul domeniilor de măsură (36) se pune pe IV sau pe domeniul de măsură utilizat.

c) Se apasă butonul de măsură (29) iar deviaţia spotului galvanometrului

se compensează cu compensatorul curentului de întuneric (21).

2.3. Egalizarea valorilor de gol.

a) Se stabileşte lungimea de undă de măsură pe scala lungimilor de undă (7) cu rozeta lungimilor de undă (38).

b) Schimbătorul probelor se pune pe L (valoarea de gol).

c) Cu potenţiometrul valorii de gol, grosier (37), buton mic, se reglează o anumită valoare de zero (7 diviziuni pe scală). O valoare mare de gol duce la o bună reproductibilitate a măsurătorilor însă duce şi la o lărgire de bandă spectrală.

d) Se apasă butonul de măsură (29) şi deviaţia galvanometrului se compensează grosier cu rozeta fantei (1). Dacă spotul galvanometrului este mult în dreapta se micşorează fanta iar la deviaţii mari în stânga se măreşte fanta. Pentru domeniul spectral 250-380 nm (lampa cu deuteriu) se lucrează cu fante având deschiderile cuprinse între 0,6 şi 0,3. Astfel dacă se porneşte de la 250 nm cu deschiderea fantei în jur de 0,6, pe măsura creşterii lungimii de undă se micşorează fanta. Pentru domeniul spectral 370-600 nm (lampa cu incandescenţă) se lucrează cu deschideri ale fantei cuprinse între 0,06 şi 0,01.

Compensarea exactă a deviaţiei galvanometrului se face cu potenţiometrul valorii de gol fin (37), butonul mare.

2.4. Egalizarea valorilor de măsură.

a) Schimbătorul probelor se pune pe proba cercetată: M_1, M_2 sau M_3.

b) Se apasă butonul de măsură (29) şi deviaţia galvanometrului se compensează cu potenţiometrul de măsură (35). După caz domeniul de măsură se schimbă (cu comutatorul domeniilor de măsură (36)). Pe scala roşie se citeşte extincţia iar pe scala neagră transmisia..

De exemplu dacă se citeşte extincţia (scala roşie), o deplasare a spotului în dreapta denotă că diviziunea respectivă pe scală este prea mare, iar o deplasare a spotului în stânga arată că diviziunea aleasă pe scală este prea mică.

Cap.X. Analiza spectrală utilizând spectrele Raman de vibrație ale moleculelor.

X.1. Noțiuni generale despre spectrele Raman de vibrație ale moleculelor.

X.1.1. Efectul Raman normal.

Aceste efect apare în cazul când soluția unei anumite substanțe este iradiată cu o radiație monocromatică (υ_0) din afara benzii electronice de absorbție a moleculelor acelei substanțe. Analizându-se, cu ajutorul unui aparat spectral, spectrul radiației difuzate (de obicei la 90^0 față de direcția radiațiilor incidente, excitatoare) se constată că acesta conține alături de linia υ_0 și alte linii de diverse frecvențe $\upsilon_i^{'}$, mai mari sau mai mici decât υ_0. Dacă rezoluția aparatului spectral nu este prea mare, radiațiile de frecvență $\upsilon_i^{'}$ apar ca niște „linii" relativ înguste, asemănătoare cu liniile din spectrele infraroșii.

Liniile de frecvență $\upsilon_i^{'}$ au fost denumite linii Raman (sau sateliți Raman), ele formând spectrul Raman al substanței și anume spectrul Raman de vibrație - justificarea o vom da mai jos.

Linia de frecvență υ_0, ca și a radiației excitatoare, a fost denumită linie Rayleigh, deoarece apare prin așa numita difuzie Rayleigh - o împrăștiere (difuzie) pe neomogenitățile provocate de fluctuațiile de densitate ale mediului.

Intensitatea spectrului Raman este foarte mică acestuia revenindu-i circa 0,1-0,2% din intensitatea radiației incidente (υ_0), restul de 99,9% revenindu-i liniei Rayleigh. Din acest motiv, în condiții obișnuite, liniile Raman nu pot fi observate.

Pentru a se putea înregistra spectrele Raman se utilizează ca surse spectrale fie lămpi cu vapori de mercur de mare putere, fie laseri, iar ca detectori fie plăci fotografice, fie multiplicatori sau alte tipuri de detectoare de mare sensibilitate.

Se poate vorbi de fapt de două spectre Raman identice, unul

format din liniile Stokes (pentru care $\upsilon_i^{'} < \upsilon_0$), iar celălalt, simetric cu primul față de linia υ_0, format din liniile anti-Stokes (având $\upsilon_i^{'} > \upsilon_0$). Spectrul anti-Stokes are o intensitate mult mai mică decât spectrul Stokes, cam de 2-3 ori mai mică. Aproape 0,07% din intensitatea liniei υ_0 revine liniilor Stokes şi doar 0,03% liniilor anti-Stokes.

Se obişnuieşte ca spectrele Raman să se reprezinte nu în funcţie de frecvenţa υ ci în funcţie de diferenţa $\Delta\upsilon_R = \upsilon_i^{'} - \upsilon_0$, diferenţă numită deplasare Raman.

Pentru exemplificarea celor de mai sus, în fig. 1 se prezintă spectrul Raman al tetraclorurii de carbon (CCl_4), excitat cu radiaţia laser având $\upsilon_0 = 20492\,cm^{-1}$ $(\lambda_0 = 488\,nm)$.

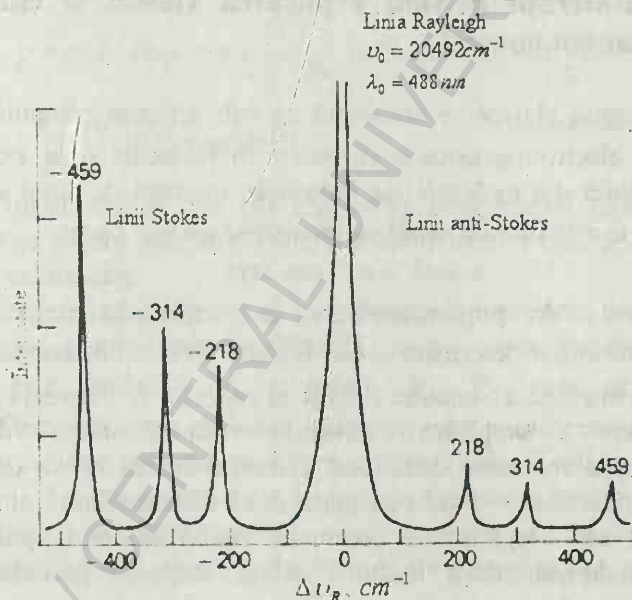


Fig. 1. O porţiune din spectrul Raman al CCl_4.

Trebuie de notat că spectrul Raman al CCl_4 mai are încă două perechi de linii, la $\pm 762\ cm^{-1}$ şi la $\pm 790\,cm^{-1}$.

S-au pus în evidenţă următoarele caracteristici importante ale

spectrelor Raman (ale efectului Raman):

a) Liniile Raman, caracterizate prin deplasarea $\Delta\upsilon_R$, coincid cu o serie de linii (frecvenţe) de vibraţie ale moleculelor, unele din aceste linii întâlnindu-se şi în spectrul IR al moleculelor respective,

b) Liniile Raman, spre deosebire de liniile din spectrul IR, sunt polarizate (în cazul când radiaţia excitatoare nu e polarizată), gradul de polarizare depinzând de structura moleculelor,

c) Spectrul Raman (mai exact mărimile deplasărilor Raman) nu depinde de frecvenţa, sau lungimea de undă, a radiaţiei excitatoare.

X.1.2. Consideraţii privind explicarea clasică şi cuantică a efectului Raman normal.

În teoria clasică se consideră că sub acţiunea câmpului electric $\vec{E}$ al undei electromagnetice excitatoare, în moleculă (mai exact într-o anumită legătură din moleculă) se induce un moment de dipol electric $\vec{p}$, a cărui mărime este proporţională cu intensitatea acelui câmp:

(1) $$p = \alpha E = \alpha E_0 \cos 2\pi\upsilon t\ ,$$

unde constanta de proporţionalitate, α, reprezintă polarizabilitatea legăturii, o măsură a deformării acelei legături în câmpul electric; E_0 este amplitudinea maximă a câmpului electric al undei iar υ frecvenţa ei.

Pentru a simplifica explicaţiile vom considera vibraţia de întindere a unei molecule diatomice. Polarizabilitatea α va depinde de distanţa interatomică, r, fiind mai mare când distanţa dintre atomi creşte şi mai mică când legătura se contractă. Astfel că, în timpul vibraţiei moleculei, polarizabilitatea legăturii suferă fluctuaţii periodice, cu o viteză dată de: $\frac{\partial\alpha}{\partial r}$. Polarizabilitatea la un anumit moment de timp va putea fi scrisă astfel:

(2) $$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial\alpha}{\partial r}\right) r_0 \cos 2\pi\upsilon_m t\ ,$$

unde r_0 este distanţa de echilibru dintre atomi, α_0 este polarizabilitatea legăturii la această distanţa, iar υ_m este frecvenţa de vibraţie a moleculei.

Înlocuind (2) în (1) se obţine:

$$p = \left[\alpha_0 + \left(\frac{\partial\alpha}{\partial r}\right) r_0 \cos 2\pi\upsilon_m t\right] E_0 \cos 2\pi\upsilon t = \alpha_0 E \cos 2\pi\upsilon t + \left(\frac{\partial\alpha}{\partial r}\right) r_0 E_0 \cos 2\pi\upsilon_m t \cos 2\pi\upsilon t. \quad (3)$$

Ţinând seama de relaţia trigonometrică:

$$\cos x \cos y = \frac{1}{2}\left[\cos(x+y) + \cos(x-y)\right],$$

ecuaţia (3) devine:

$$p = \alpha_0 E_0 \cos 2\pi\upsilon t + \frac{1}{2}\left(\frac{\partial\alpha}{\partial r}\right) r_0 E_0 \cos 2\pi t(\upsilon + \upsilon_m) + \frac{1}{2}\left(\frac{\partial\alpha}{\partial r}\right) r_0 E_0 \cos 2\pi t(\upsilon - \upsilon_m). \quad (4)$$

Primul termen din (4) reprezintă componenta momentului de dipol electric pentru linia Rayleigh, a cărei frecvenţă este egală cu aceea a radiaţiei excitatoare.

Termenii al doilea şi al treilea din (4) reprezintă momentele de dipol electric pentru radiaţia difuzată, pentru care frecvenţa radiaţiei incidente este modulată de termenul $\pm\upsilon_m$, frecvenţa de vibraţie a legăturii. Deci frecvenţa radiaţiei incidente este modificată de frecvenţa vibraţiei moleculare, ceea ce duce la apariţia sateliţilor Raman.

Este important de notat faptul că existenţa liniilor Raman implică ca polarizabilitatea legăturii să varieze în funcţie de distanţa interatomică. Astfel, pentru ca legătura să fie Raman activă, trebuie ca:

$$\frac{\partial\alpha}{\partial r} \neq 0.$$

Teoria clasică nu a putut explica (printre altele) o caracteristică importantă a spectrelor Raman şi anume aceea că liniile anti-Stokes au o intensitate mult mai mică decât a celor Stokes.

<u>În teoria cuantică</u> difuzia Raman normală se explică prin

interacţiunea ("ciocnirea") neelastică dintre fotonii fasciculului incident şi moleculele mediului, aflate în diverse stări de vibraţie (se poate neglija energia de rotaţie deoarece, în cazul utilizării unor aparate spectrale nu foarte performante, nu mai poate fi pusă în evidenţă şi structura de rotaţie a diverselor "linii" de vibraţie).

Să considerăm un şir de nivele de vibraţie ale moleculei pentru starea ei electronică fundamentală: fig. 2.

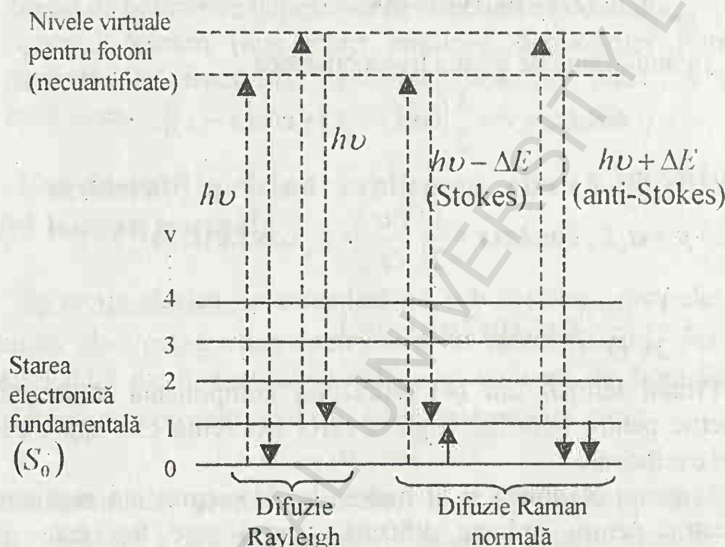


Fig. 2. Explicarea cuantică a difuziei Raman normale.

Pentru a explica calitativ difuzia Raman normală vom considera un foton de energie hv, oarecare, care se ciocneşte (interacţionează) cu o moleculă. Tranziţiile moleculei le vom figura cu linii pline iar "tranziţiile" corespunzătoare fotonilor incidenţi şi difuzaţi le vom figura cu linii întrerupte – săgeata cu vârful în sus indicând fotonul incident iar săgeata cu vârful în jos fotonul difuzat. Natural că e vorba de tranziţii între nivele de energie imaginare (virtuale). Aceste nivele virtuale s-au introdus pentru a uşura explicarea fenomenului Raman.

În stânga diagramei am figurat difuzia Rayleigh, difuzie explicată considerând că are loc o ciocnire elastică dintre fotonul incident

şi moleculă, aflată fie pe nivelul de vibraţie cel mai coborât al stării electronice fundamentale (de obicei nivelul cu v = 0), fie pe alte nivele de vibraţie, nivele ce sunt populate conform legii lui Boltzmann (deci în funcţie de temperatura mediului). Molecula având o masă foarte mare în raport cu fotonul, energia acesteia nu se va modifica iar fotonul difuzat va avea aceeaşi energie $h\nu$ ca şi cel incident.

În cazul ciocnirii neelastice a fotonului incident cu o moleculă aflată pe nivelul cu v=0, acesta poate ceda o parte din energia sa (ΔE) moleculei pentru a o trece pe un nivel de vibraţie superior, cu v=1,2,3.... Fotonii difuzaţi în acest fel vor avea diverse frecvenţe $\nu_i' < \nu$ (linii Stokes), cuantele liniilor Raman coincizând cu cuantele corespunzătoare tranziţiilor din starea cu v=0 pe nivele de vibraţie superioare ale stării electronice fundamentale.

În cazul ciocnirii neelastice a fotonului incident cu o moleculă aflată pe un anumit nivel de vibraţie având v≠0, de exemplu pe nivelul cu v=1 (nivel evident, mai puţin populat decât cel cu v=0), fotonul difuzat poate prelua surplusul de energie de vibraţie ΔE al moleculei (surplus numit şi rezervă de energie de vibraţie) astfel încât energia lui să devină: $h\nu+\Delta E = h\nu'$. În acest fel se explică calitativ atât apariţia liniilor anti-Stokes cât şi faptul că acestea au o intensitate mult mai mică decât cele Stokes.

Se observă că în cazul difuziei Raman normale fotonul incident poate avea orice energie hv, cu condiţia ca frecvenţa υ să nu aparţină vreunei benzi electronice de absorbţie a moleculei, adică nivelele virtuale nu sunt cuantificate. Deoarece intensitatea radiaţiilor împrăştiate este proporţională cu $\frac{1}{\lambda^4}$, ca şi în cazul difuziei Rayleigh (legitate ce explică culoarea albastră a cerului, de exemplu), ar fi recomandabilă utilizarea unor radiaţii excitatoare având lungimea de undă cât mai mică. Acest lucru nu e întotdeauna avantajos, cum vom vedea mai jos.

X.1.3. Efectul Raman de rezonanţă.

În cazul difuziei Raman de rezonanţă, fotonul incident are o energie egală cu aceea a unui nivel de vibraţie dintr-o stare electronică

excitată, S_1, S_2 etc. a moleculei (fig. 3). Existând o „rezonanță" (energetică) între cele două particule ce se ciocnesc (fotonul şi molecula), probabilitatea ciocnirilor neelastice creşte mult ceea ce determină şi o creştere importantă a intensităților liniilor Raman, cu un factor de la 10^2 la 10^6 ori, față de cazul difuziei Raman normale. (Acest efect nu poate fi explicat în cadrul fizicii clasice.)

Trebuie totuşi de specificat faptul că fotonul difuzat nu este un foton de fluorescență. Acest lucru e demonstrat şi de faptul că timpul după care este emis fotonul difuzat (numit timp de relaxare Raman) este mai mic de $10^{-14} s$, pe când timpul după care apare fluorescența (care este egal cu timpul de viață al stării electronice excitate de circa: $10^{-8}-10^{-6} s$. În fig. 3 s-a trecut şi tranziția de fluorescență, $v'=0 \rightarrow v''=0$ în cazul fazei condensate (a unei soluții), situația cel mai des întâlnită în cazul analizelor ce utilizează spectrele Raman.

Fig. 3. Explicarea efectului Raman de rezonanță, în cazul liniilor Stokes: a) şi b), Săgețile îngroşate aparțin unei tranziții de fluorescență a moleculei. c) corespunde efectului Raman normal.

Din fig. 3 se observă că difuzia Raman a diferitelor radiații excitatoare din ultravioletul ceva mai îndepărtat (cazul a)), din ultravioletul apropiat şi vizibil (cazul b)) sau din vizibil şi infraroşu apropiat (cazul c)) produce aceeaşi variație a energiei de vibrație a moleculei. Prin urmare radiația excitatoare se poate alege astfel încât să se elimine suprapunerea spectrului Raman cu cel din fluorescență.

Dacă se studiază mediile biologice, care conțin multe molecule fluorescente, se observă că în cazul b) frecvențele radiațiilor de fluorescență sunt apropiate de cele Raman, ceea ce determină un fond de fluorescență intens. În cazurile a) şi c), deoarece frecvențele liniilor Raman diferă mult de cele de fluorescență, fondul de fluorescență din spectrul Raman este eliminat.

Spre deosebire de spectrele obținute în cazul efectului Raman normal, spectre ce pot avea un număr relativ mare de linii (vezi fig. 4 şi 7) spectrele Raman de rezonanță sunt mult mai simple deoarece numai câteva moduri de vibrație contribuie la împrăştiere.

X.1.4. Comparație între spectrele IR şi cele Raman cât şi în ce priveşte aplicațiile lor.

Din cele arătate din paragrafele anterioare rezultă că ambele tipuri de spectre sunt datorate tranzițiilor moleculei între diferitele nivele de vibrație ale stării electronice fundamentale. Din acest motiv s-ar părea că cele două tipuri de spectre ar trebui să coincidă. Totuşi, spectrul Raman al unei substanțe nu este identic cu spectrul IR: vezi fig. 4.

Necoincidența celor două tipuri de spectre se datorează faptului că în spectrul IR sunt active (absorb) doar acele vibrații ce determină variația momentului de dipol al moleculei, pe când în spectrul Raman sunt active acele vibrații ce determină o variație a polarizabilității moleculei. Dacă, în urma excitării unor vibrații normale, variază atât momentul de dipol cât şi polarizabilitatea, atunci acele moduri de vibrație vor fi active în ambele tipuri de spectre.

Conform celor de mai sus, cele două tipuri de spectre sunt într-o oarecare măsură complementare deoarece fiecare dintre ele este asociat cu un anumit set de moduri de vibrație ale moleculei. Deci o cercetare

completă a substanţei necesită utilizarea ambelor tipuri de spectre.

Un avantaj important al utilizării spectrelor Raman în analize biomedicale, şi nu numai, este legat de faptul că pe de o parte apa nu prezintă un spectru Raman în domeniile spectrale de interes pentru aceste analize, pe de altă parte spectrul Raman al apei este puţin intens.

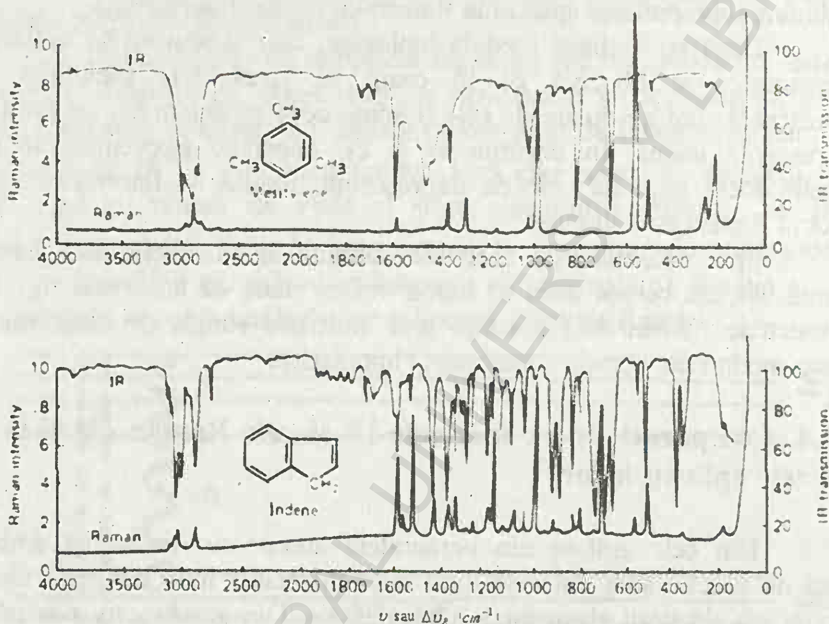


Fig. 4. Comparaţie între spectrele Raman şi cele IR.

În fig. 5 şi 6 se prezintă, pentru comparaţie spectrele IR ale lichidelor H_2O şi D_2O, respectiv cele Raman.(Obs. Spre deosebire de spectrele moleculelor individuale , care sunt formate din "linii" relativ înguste , spectrele lichidelor cum ar fi apa , alcoolii etc., ale căror molecule se leagă prin punţi de hidrogen , sunt alcătuite din benzi largi).

Deşi spectroscopia Raman este utilizată pentru analize chimice şi moleculare de mai mulţi ani, aplicarea ei în biologie şi medicină este relativ recentă. Studiile Raman ale ţesuturilor biologice au fost iniţiate abia în ultimii 10-15 ani, datorită dezvoltării unor tehnologii avansate, în particular în domeniul laserilor şi al detectorilor. În momentul de faţă,

dintre metodele optice şi spectrale ce se aplică în biologie şi medicină pentru studiul compoziţiei chimice a ţesuturilor, spectroscopia Raman oferă cele mai detaliate informaţii, fiind una din metodele cel mai puţin dăunătoare pentru aceste ţesuturi.

Întrucât evoluţia unei boli este însoţită de modificări chimice, spectroscopia Raman poate oferi medicului o serie de date preţioase

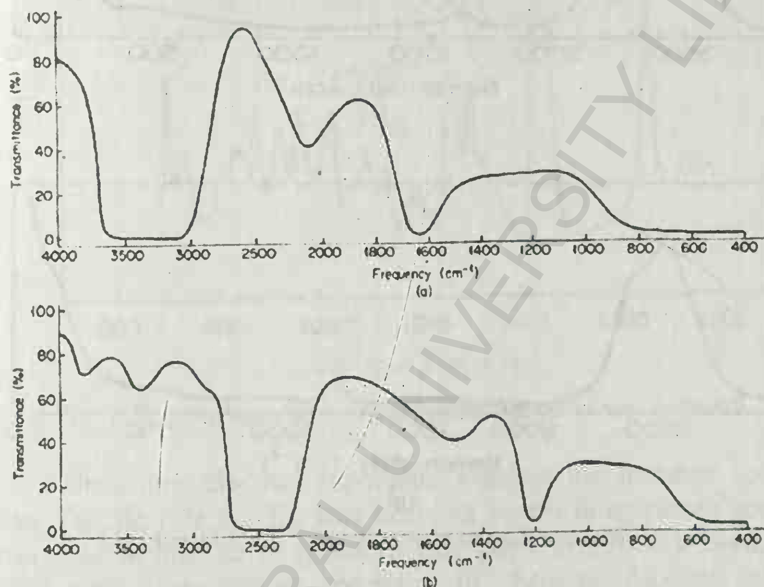
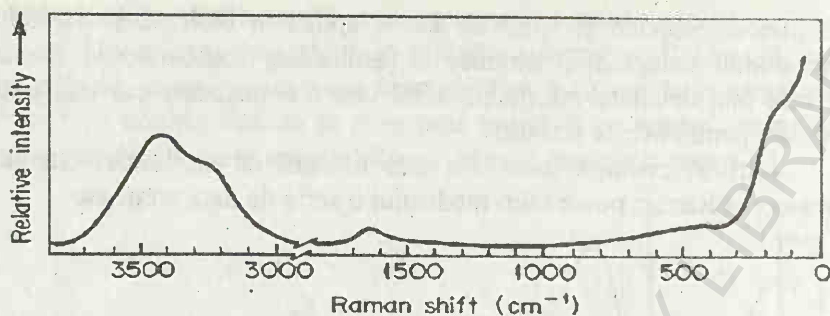


Fig.5. Spectrul infraroşu de absorbţie al apei lichide din regiunea 4000-400cm^{-1}. Grosimea stratului $= 25\mu m$. (a) H_2O; (b) D_2O.

pentru diagnosticarea bolii.

Spectroscopia Raman poate fi aplicată şi „in vivo”, dând informaţii necesare într-un timp scurt, aceasta deoarece lumina poate fi trimisă şi colectată rapid prin fibre optice care pot fi incorporate în endoscoape sau în alte dispozitive similare. În prezent puţine tehnici sunt capabile de a face o analiză biochimică a ţesuturilor „in vivo”.



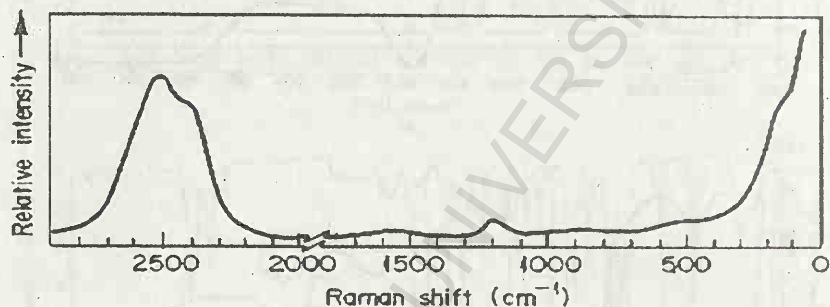


Fig. 6. Spectrul Raman al apei lichide: (a) H_2O; (b) D_2O.

Spectrele Raman ale țesuturilor biologice sunt constituite, în general, din benzi relativ înguste, având lățimea tipică de 10-20 cm^{-1}, benzi caracteristice biomoleculelor prezente în acele țesuturi. De exemplu, dacă proba de țesut conține colesterol, liniile (picurile) Raman corespunzătoare acestei substanțe vor fi prezente și în spectrul Raman al acelei probe. Spectrul Raman al colesterolului este prezentat în fig. 7, indicându-se și tipurile vibrațiilor corespunzătoare.

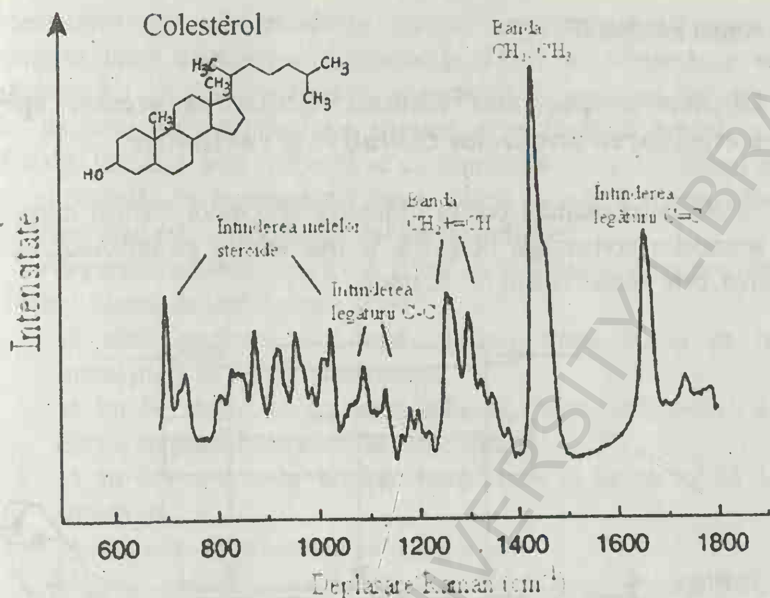


Fig. 7. Spectrul Raman al colesterolului din infraroşul apropiat.

Unul din cele mai importante avantaje ale utilizării spectrelor Raman, faţă de cele din IR, este acela că pentru înregistrarea spectrelor Raman este nevoie de o aparatură mai puţin costisitoare decât aceea utilizată pentru înregistrarea spectrelor IR. Aceasta, deoarece spectrele Raman sunt situate, în funcţie de frecvenţa radiaţiei excitatoare, fie în domeniile ultraviolet şi vizibil, fie în domeniul IR apropiat, domenii pentru care se poate utiliza sticla obişnuită sau cuarţul, atât pentru componentele optice ale aparatului cât şi pentru cuvele cu soluţie, materiale mai ieftine şi mai puţin pretenţioase (fiind nehigroscopice) decât cele utilizate pentru domeniul 4000-400 cm^{-1} (25000-250000 Å), domenii în care se înregistrează spectrele IR.

Avantaje sunt şi în ce priveşte receptorii de radiaţii, cei utilizaţi pentru înregistrarea spectrelor Raman fiind mult mai ieftini şi mai eficienţi, decât cei utilizaţi pentru înregistrarea spectrelor IR. Din acest motiv, pentru înregistrarea spectrelor Raman se poate utiliza şi metode dispersivă, alături şi de cea nedispersivă (mai costisitoare), ce utilizează

transformata Fourier (FTR).

X.2. Obținerea spectrelor Raman. Utilizarea acestor spectre pentru efectuarea analizelor calitative și cantitative.

Schema montajului pentru obținerea spectrelor Raman normale în cazul aparatelor comerciale obişnuite şi mai ieftine, ce utilizează metoda dispersivă, este prezentată în fig. 8, unde:

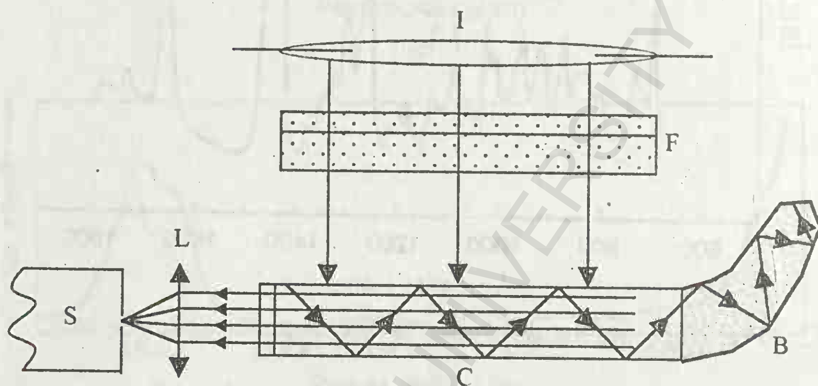


Fig. 8. Schema simplificată a unei instalații pentru înregistrarea spectrului Raman.

I: sursa de radiaţii excitatoare, o lampă cu vapori de mercur sau un laser.

F: filtru dublu (sticlă şi apă), utilizat în cazul folosirii la excitare a unei lămpi cu vapori de mercur, având atât rolul de-a transmite radiații monocromatice cât şi pentru a absorbi radiaţiile IR emise de sursă, pentru a evita încălzirea probei.

C: cuva cu substanţa de cercetat (în stare de gaz, de lichid sau pulbere cristalină ; de obicei se utilizează fie starea lichidă, fie soluțiile probei de analizat), cuva se termină cu un fel de corn înnegrit, zonă în care se absorb (parțial) radiaţiile excitatoare care se reflectă de pereţii cuvei.

S: instrumentul spectral pe fanta căruia este concentrată radiația difuzată, cu ajutorul lentilei L.

Deoarece intensitatea radiaţiilor împrăştiate este proporţională

cu intensitatea radiațiilor incidente, acestea sunt concentrate asupra cuvei cu ajutorul unor dispozitive convenabile. Dacă se folosește o singură lampă liniară (ca cea din figură), aceasta se dispune pe una din axele focale ale unei oglinzi cilindrice eliptice, cuva fiind în lungul celeilalte axe focale. În cazul altor dispozitive de iluminare sursa de radiații este de formă elicoidală, ea înconjurând cuva, filtrul F având formă cilindrică. Întreg ansamblul este introdus într-un înveliș reflector.

Alegerea radiației incidente (deci și a filtrului corespunzător) se face ținând seama de următoarele criterii:

- să aibă lungimea de undă cât mai mică, astfel ca radiația împrăștiată să fie cât mai intensă,
- să nu fie absorbită de către substanța cercetată, pentru a nu fi oprită de primele straturi de substanță,
- să nu dea naștere la radiație Raman care să fie absorbită de acea substanță,
- să nu excite fluorescența substanței,
- să nu cauzeze descompunere fotochimică a substanței de cercetat.

Radiațiile ultraviolete, deși au lungimea de undă mai mică decât a celor din domeniul vizibil, sunt folosite mai rar, ne îndeplinind celelalte condiții. Dintre radiațiile mercurului cele mai folosite sunt, în ordinea importanței, cele cu: λ =4358 Å, 4047 Å, 5461 Å și 3650 Å (UV).

Cuvele folosite pentru lichide sunt, de regulă, de formă cilindrică cu diametrul de 1-2 cm și lungimea de 10-15 cm, conținând 50-100 cm^3 lichid. În unele montaje se folosesc și cuve cu capacitatea de 0,1-1 cm^3, uneori chiar mai mică.

Înregistrarea spectrelor Raman se face cu aparate spectrale ce lucrează în UV-VIS, ne fiind nevoie de o optică specială ca și în cazul spectrofotometrelor pentru IR. Optica este de obicei din sticlă pirex ce este transparentă atât în domeniul UV- apropiat cât și în IR-apropiat. Nu este nevoie ca puterea de rezoluție a aparatelor spectrale să fie prea mare, fiind suficientă, de exemplu, o putere de rezoluție de ordinul lui 5000, în domeniul spectral din jurul lui 4500 Å.

Ca receptori de radiații se folosesc fie plăci fotografice, acestea permițând înregistrarea și a unor linii Raman foarte slabe mărindu-se timpul de expunere, fie fotomultiplicatori sau fotodiode.

În cazul înregistrării fotografice a spectrelor, determinarea lungimii de undă a liniilor Raman (prima etapă a analizei calitative) se face cu ajutorul unui spectru de comparaţie care are un număr mare de linii standard, a căror lungimi de undă este cunoscută, spectru ce se înregistrează alături de spectrul de analizat. Astfel, dacă excitarea probei se face cu o lampă cu mercur sau cu un laser cu argon, drept spectru de referinţă poate fi ales spectrul în arc al fierului. Dacă excitarea probelor se face cu un laser cu He - Ne, atunci drept spectru de referinţă se foloseşte spectrul neonului. Măsurătorile în vederea determinărilor de lungimi de udă se fac cu ajutorul microscopului comparator Abbé (vezi laborator).

Schema unei instalaţii Raman moderne, utilizată în medicină pentru efectuarea unor analize „in vivo" este prezentată în fig. 9.

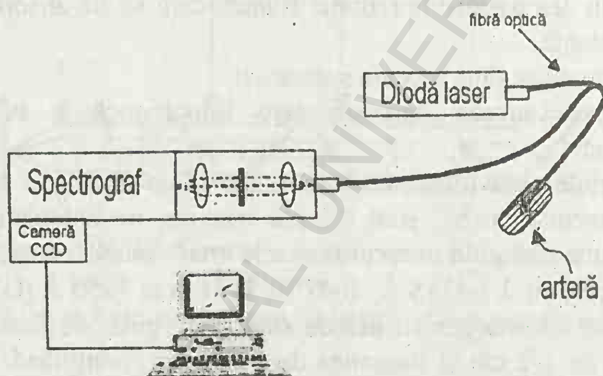


Fig. 9. Instalaţie Raman pentru diagnostic „in vivo".

Pentru analizele „in vivo" se utilizează de obicei, ca surse de radiaţii excitatoare, laserii ce emit în infraroşu apropiat pentru că, pe de o parte, se reduce fondul datorat fluorescenţei diferitelor biomolecule prezente în ţesuturi, iar pe de altă parte, lumina din IR apropiat poate penetra ţesutul, la adâncimi de ordinul milimetrilor.

Analizele calitative şi de structură bazate pe spectrele Raman se fac în mod asemănător cu cel efectuate pe baza spectrelor IR. Existenţa a prea multor compuşi în proba de analizat ar face ca analiza să fie practic imposibil de realizat din cauză că unele linii Raman s-ar suprapune. Din

acest motiv se obişnuieşte ca în cazul unor amestecuri de lichide (cum este de exemplu ţiţeiul –amestecul unui număr mare de hidrocarburi) să se analizeze diverse fracţii de distilare (în cazul ţiţeiului se recomandă ca, pentru aceste fracţii, temperatura de distilare să varieze cu cel mult 10-15°C). În cazul amestecului de mai mulţi compuşi solizi s-ar putea utiliza procedeul extracţiei cu solvenţi.

Analiza cantitativă, folosind spectrele Raman, se bazează pe faptul că în cazul unei probe, ce conţine mai mulţi componenţi, intensitatea liniilor spectrale corespunzătoare fiecărui component este de obicei proporţională cu concentraţia componentului respectiv, în limite de concentraţii destul de largi. Astfel că, pentru efectuarea analizei cantitative mai întâi trebuie să se măsoare experimental intensităţile relative a liniilor diverselor componente existente în amestec, identificate în prealabil prin analiza calitativă (Practic se utilizează 3-4 linii pentru fiecare componentă). Aceste intensităţi se compară apoi cu cele ale componentelor pure din tabele. Este necesar ca determinarea experimentală a intensităţilor folosite în analiza cantitativă să fie făcută în aceleaşi condiţii (deschiderea fantei, viteza de înregistrare etc.) în care s-au obţinut şi intensităţile din tabele. De obicei se utilizează fie intensitatea la maximul liniei, I_0, fie intensitatea integrală, I_∞ (Fig. 5).

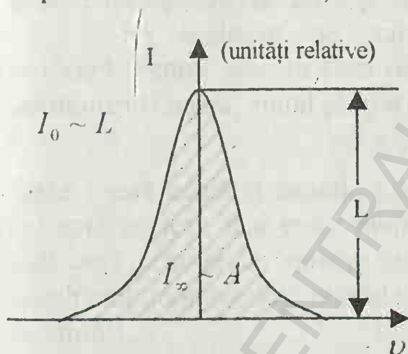


Fig.5. Aspectul unei linii Raman.

Măsurarea acestor mărimi se face prin compararea cu intensităţile unor linii standard. Drept linie standard se utilizează de obicei linia $\Delta\nu_R$ =802 cm^{-1} a ciclohexanului, pentru care intensitatea la maximum se ia egală cu 250 unităţi, iar intensitatea integrală este luată egală cu 500 unităţi.

Drept standard se mai folosesc şi alte linii cum ar fi linia 459 cm^{-1} a tetraclorurii de carbon, linia 992 cm^{-1} a benzenului etc.

Pentru a măsura cele două tipuri de intensităţi se înregistrează cele două spectre (a probei şi a standardului extern) în aceleaşi condiţii (fotografic sau fotoelectric) şi pentru aceeaşi cantitate de substanţă

(aceeaşi cuvă). În această situaţie I_0 şi I_∞ vor fi date de formulele de mai jos:

$$I_0 = 250\frac{L}{L_{802}}\frac{n^2}{n_{cicl}^2}\frac{S}{S_{802}} \quad ; \quad I_\infty = 500\frac{A}{A_{802}}\frac{n^2}{n_{cicl}^2}\frac{S}{S_{802}},$$

unde:

L = valoarea maximă a ordonatei conturului liniei spectrale analizate (în unităţi relative – diviziuni),

n = indicele de refracţie al substanţei,

S = sensibilitatea spectrală a plăcii fotografice sau a fotomultiplicatorului,

A = aria delimitată de conturul liniei date (măsurată, de exemplu, cu planimetrul),

L_{802}, n_{cicl}, S_{802} şi A_{802} sunt mărimile analoage pentru ciclohexan.

Cap. XI. Spectroscopia de rezonanță magnetică nucleară.

XI.1. Principiile spectroscopiei de rezonanță magnetică nucleară.

Spectroscopia de rezonanță magnetică nucleară (RMN) a devenit în ultimele decenii una din cele mai eficace şi mai larg utilizate metode fizice aplicate în studiul structurii moleculare. Se pot obține atât informații de natură "statică" (în cazul moleculelor care nu-si modifică structura în timp) cât şi informații de natură dinamică care să indice modificarea structurii la diferite momente de timp, cum se întâmplă de exemplu în cazul reacțiilor chimice în cazul unor molecule cu structură fluctuantă etc.

Pe lângă aplicațiile privind structura moleculară, spectroscopia RMN este utilizată frecvent în multe domenii în scopul efectuării unor analize moleculare calitative şi cantitative.

Să analizăm pe scurt fenomenul de rezonanță magnetică nucleară. Pentru aceasta vom reaminti faptul că nucleele atomilor posedă un moment cinetic, numit şi spin nuclear, al cărui modul e dat de relația:

$$P_I = \hbar\sqrt{I(I+1)},$$

unde I este numărul cuantic total, sau intern al nucleului, el numindu-se tot spin nuclear, mai exact număr cuantic de spin al nucleului; I poate fi atât zero, cât şi un număr întreg sau semiîntreg. Spinul nuclear este rezultanta momentelor orbitale şi de spin ale nucleonilor (protoni şi neutroni).

Momentului $\vec{P}_I$ i se asociază un moment magnetic efectiv $\vec{\mu}_I$, numit moment magnetic de spin, al cărui modul se cuantifică conform relației:

$$\mu_I = g_I \mu_N \sqrt{I(I+1)},$$

unde : g_I este factorul giromagnetic nuclear (factorul Landé nuclear),

μ_N reprezintă magnetonul nuclear, el având valoarea :

$$\mu_N = \frac{eh}{4\pi m_p} \cong 5\cdot 10^{-27}\ A\cdot m^2 \cong \frac{\mu_B}{1836};$$

μ_B = magnetonul Bohr-Procopiu: $\mu_B = \dfrac{eh}{4\pi m_0} \cong 9{,}3\cdot 10^{-24}\ A\cdot m^2$,

m_p şi m_0 fiind masa de repaus a protonului, respectiv a electronului.

Raportul dintre momentul magnetic şi momentul cinetic corespunzător se numeşte raport giromagnetic (γ). În cazul nucleului raportul giromagnetic este:

$$\gamma = \frac{\mu_I}{P_I} = \frac{g_I \mu_N}{\hbar} = g_I \frac{e}{2m_p}.$$

Informaţii privind spinul nuclear I, pentru starea fundamentală a nucleelor, se pot obţine din următoarele reguli empirice:

a) Nucleul cu un număr par de protoni şi un număr par de neutroni are I=0 (deci şi $P_I = 0$ şi μ_I =0). Exemple : ${}^{12}_{6}C, {}^{16}_{8}O, {}^{32}_{16}S$ etc.

b) Dacă nucleul conţine un număr impar dintr-unul din tipurile de particule (protoni sau neutroni) I este semiântreg (număr impar de ½). Exemple : ${}^{1}_{1}H, {}^{13}_{6}C, {}^{15}_{7}N : I = 1/2$ ${}^{11}_{5}B : I = 3/2, {}^{17}_{8}O : I = 5/2$

c) Dacă ambele tipuri de particule sunt în număr impar, valoarea lui I este un număr par de ½ (deci un număr întreg de 1,2,3…). Exemple : ${}^{2}_{1}H : I = 1$, ${}^{10}_{5}B : I = 3$, ${}^{14}_{7}N : I = 1$.

Regulile a) şi b) pot fi explicate dacă se apelează la modelul în pături al nucleului, schema Mayer-Jensen, precum şi la regulile de cuplaj Mayer-Jensen-Schmidt. Aceste probleme sunt tratate în cursurile de fizică nucleară. Vom reaminti doar regulile de cuplaj.

Regula I. Stările fundamentale ale nucleelor pare-pare au un moment cinetic total nul. Conform acestor reguli momentul cinetic total al neutronilor şi al protonilor este nul fiecare în parte. Ca o consecinţă a acestui fapt, în nucleele cu Z par şi N impar proprietăţile stării fundamentale sunt determinate numai de configuraţiile neutronice, iar în nucleele cu Z impar şi N par proprietăţile amintite sunt determinate numai de configuraţiile protonice.

Regula II. Într-un nucleu cu A impar, nucleonii de aceeaşi specie existenţi în număr par îşi cuplează momentele lor cinetice în aşa

fel încât, în general, spinul nuclear este identic cu momentul cinetic (cu spinul) al ultimului nucleon rămas necuplat (situat pe ultimul nivel nuclear parţial ocupat numit nivel activ). Nucleonul de pe nivelul activ poate fi considerat un fel de „nucleon de valenţă".

Deci în cazul nucleelor ${}_1^1H$, ${}_6^{13}C$ şi ${}_7^{15}N$, de exemplu, spinul I se datorează unui nucleon necuplat, pentru care spinul este 1/2:

- unui proton aflat în starea $1s_{1/2}$, în cazul ${}_1^1H$,
- unui neutron aflat în starea $1p_{1/2}$, în cazul ${}_6^{13}C$,
- unui proton aflat în starea $1p_{1/2}$, în cazul ${}_7^{15}N$.

Dacă nucleul, mai exact atomul căruia îi aparţine nucleul (ne referim pentru început la un atom izolat), este plasat într-un câmp magnetic "intens pentru structura hiperfină", având inducţia $\vec{B}$ de o astfel de valoare încât desface cuplajul dintre momentele $\vec{\mu_I}$ şi $\vec{\mu_J}$ ($\vec{\mu_J}$ fiind momentul magnetic creat la atom de către învelişul electronic) atunci, datorită interacţiunii lui $\vec{\mu_I}$ cu $\vec{B}$, acel nucleu va căpăta o energie suplimentară dată de relaţia:

$$E_{mI} = -\left(\vec{\mu_I} \cdot \vec{B}\right) = -g_I \mu_N B \cdot m_I,$$

unde m_I este numărul cuantic magnetic nuclear. Acest număr cuantifică proiecţiile lui $\vec{\mu_I}$ pe direcţia lui $\vec{B}$, el putând lua valorile:

$$m_I = I, I-1, \ldots, -I,$$

adică $2I+1$ valori.

Datorită acestei energii suplimentare, nivelul nuclear corespunzător stării fundamentale a nucleului (deci unei anumite valori a lui I, precizate mai sus) se va despica (desface) în $2I+1$ nivele (despicare Zeeman). Exemple:

$I=0$: nu avem despicare Zeeman, $I = \frac{1}{2}$: fig. 1 a), $I = \frac{3}{2}$: fig. 1 b).

Nivelele Zeeman ale protonului liber (${}_1^1H$), respectiv stările energetice ale acestuia în câmpul magnetic extern, se notează cu α, pentru $m_I = \frac{1}{2}$ şi β, pentru $m_I - = \frac{1}{2}$.

Deci starea α va corespunde cazului când spinul este paralel cu $\vec{B}$ iar starea β cazului când spinul este antiparalel cu $\vec{B}$.

Notațiile α și β se mai utilizează uneori și pentru nivelele

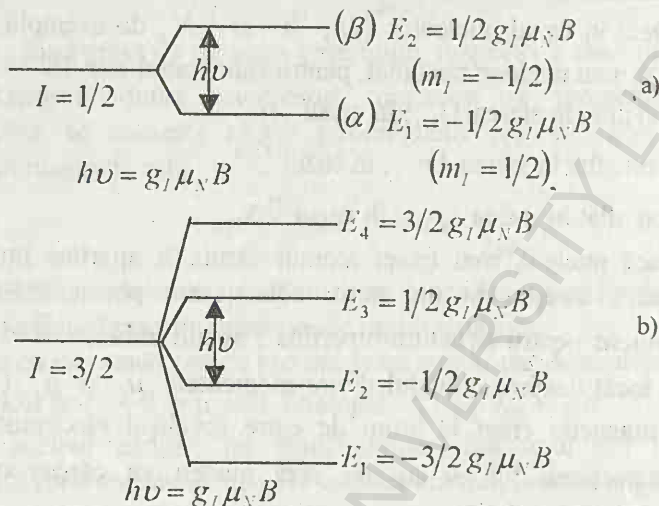


Fig. 1. Despicarea Zeeman a nivelelor nucleare într-un câmp magnetic intens pentru structura hiperfină : a) $I = 1/2$, b) $I = 3/2$.

Zeeman ale nucleelor pentru care nucleonul de valență are spinul 1/2 .

Diferențele de energie între nivelele Zeeman (de exemplu diferența $h\nu$ între două nivele vecine) ale nucleului sunt foarte mici, astfel că populațiile acestor nivele nu vor diferi prea mult, totuși ele descresc pe măsură ce energia lor crește, conform formulei lui Boltzmann. Astfel vor exista mai multe stări α decât β etc.

Dacă nucleele (izolate), aflate în câmpul magnetic B, sunt iradiate cu radiații electromagnetice de frecvență $\nu = \frac{g_I \mu_N B}{h}$ (și dacă sunt satisfăcute și alte condiții pe care le vom preciza mai jos) atunci se pot realiza atât tranziții de absorbție (de tipul $E_1 \rightarrow E_2$) cât și de emisie stimulată ($E_2 \rightarrow E_1$), primele totuși fiind mai numeroase, astfel încât, în final, are loc o absorbție de energie (absorbție slabă). Acest fenomen a

primit denumirea de rezonanță magnetică nucleară (RMN). Frecvența ν, numită frecvența de rezonanță, este de ordinul a 10^6 Hz (radiofrecvență), ea depinzând atât de tipul nucleului cât şi de B. De exemplu pentru protoni, la un câmp B=12T (limita superioară a câmpurilor ce se pot realiza astăzi), ν=500 MHz.

Se observă că în cazul protonului, de exemplu, în urma fenomenului RMN spinul nuclear (mai exact $\overrightarrow{P_I}$) îşi schimbă orientarea, din cea "paralelă" cu câmpul (m_I =1/2) în cea "antiparalelă" (m_I = -1/2), fig. 1 a).

Fenomenul RMN poate fi studiat apelându-se şi la teoria clasică (electrodinamica clasică), teorie care poate preciza mai bine unele aspecte ale acestui fenomen. (De altfel conform principiului de corespondență a lui Bohr fizica cuantică tinde la fizica clasică în cazul numerelor cuantice mari, respectiv în cazul când nivelele energetice sunt foarte apropiate).

Conform teoriei clasice dacă un nucleu este plasat într-un câmp magnetic $\vec{B}$, momentul magnetic al acestuia $\overrightarrow{\mu_I}$ va executa o mişcare de precesie în jurul lui $\vec{B}$ cu o frecvență Larmor:

$$\nu_L = \gamma\beta/2\pi = g_I \mu_N B/h,$$

adică cu o frecvență egală tocmai cu frecvența de rezonanță ν. Tot în această teorie se mai arată că dacă se mai aplică un câmp electromagnetic suplimentar, de frecvență ν_L, având inducția $\vec{B}_1 \perp \vec{B}$, şi care este polarizat circular, atunci are loc o absorbție de energie de la acest câmp (are loc o "rezonanță"), rezultatul acestei absorbții fiind schimbarea orientării momentului $\overrightarrow{\mu_I}$ din cea "paralelă" cu câmpul în cea "antiparalelă" (fig.2).

În practică se utilizează câmpuri B_1 oscilante (polarizate liniar) şi nu rotatorii, ultimele fiind mai complicat de obținut. Înlocuirea acestora se bazează pe faptul că un câmp oscilant, polarizat liniar, poate fi descompus în două câmpuri polarizate circular şi care se rotesc în sensuri opuse cu aceeaşi frecvență ν ca şi a câmpului oscilant.

Dispozitivele (aparatele) cu ajutorul cărora se poate obține, detecta şi înregistra fenomenul RMN au primit denumirea de spectrometre RMN.

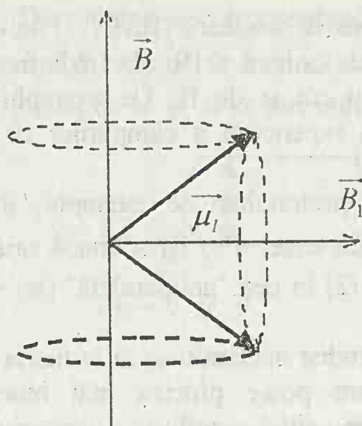


Fig. 2. Explicarea acțiunii, asupra nucleului, a câmpurilor $\vec{B}$ și $\vec{B_1}$, apelându-se la teoria clasică.

Deoarece rezonanța se poate obține variind fie B fie ν s-au creat două tipuri de spectrometre RMN –unele având ν constant și B variabil iar altele cu B constant și ν variabil.

Prezentăm în fig. 3 schema de principiu a unui spectrometru de primul tip și care folosește pentru detectarea semnalului RMN așa-numita metodă a absorbției.

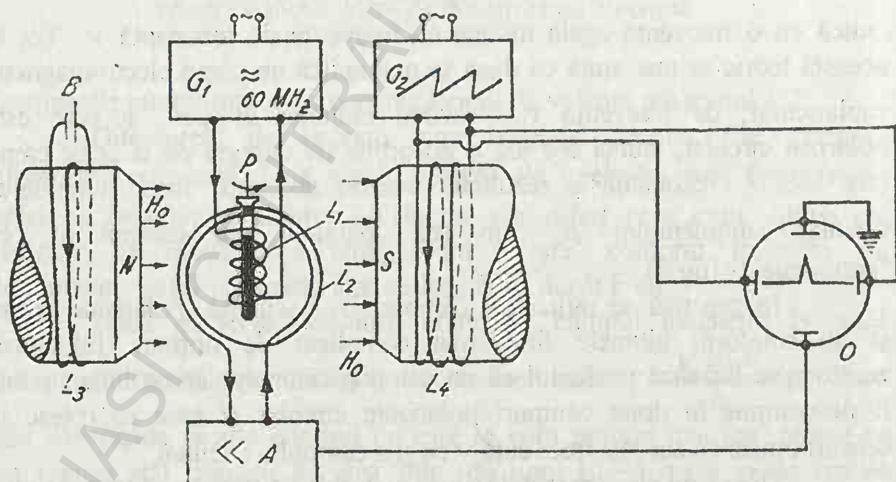


Fig. 3. Schema de principiu a unui spectrometru RMN, de tip frecvență constantă-câmp magnetic variabil utilizând, pentru detecție, metoda absorbției.

Eprubeta P cu proba (sub formă lichidă) se aşează în interiorul bobinei L_1 a generatorului de radiofrecvenţă G_1, care creează câmpul $\overrightarrow{B_1}$. Acesta oscilează cu o frecvenţă fixă ν; în mod curent se folosesc generatoare de 60, 100 şi mai recent de 200 sau chiar 500 MHz.

Bobina L_1, cu proba, este plasată într-un câmp magnetic puternic creat de un electromagnet, astfel ca axa bobinei să fie perpendiculară pe inducţia $\overrightarrow{B}$ a câmpului. În scopul îndepărtării unor efecte legate de neomogenitatea câmpului B eprubeta se roteşte ca în figură, astfel ca toate nucleele magnetice să fie supuse la acelaşi câmp mediu.

Deoarece ν este constant trebuie să se varieze B pentru a se obţine rezonanţa. Varierea lui B se face cu ajutorul unui generator de curent G_2 "în dinţi de fierăstrău", legat la bobina L_3, care este montată pe unul din polii electromagnetului. Generatorul G_2 creează şi baza de timp a osciloscopului.

Când se îndeplineşte condiţia de rezonanţă are loc o absorbţie de energie din circuitul bobinei L_1. Absorbţia este detectată de o a doua bobină L_2, perpendiculară pe prima (ca să nu fie cuplate), în care se induce un curent foarte slab prin fenomenul de inducţie magnetică nucleară, ce are loc în urma "rotirii" lui $\overrightarrow{\mu_I}$ din poziţia „paralelă cu câmpul" în poziţia „antiparalelă". Curentul din L_2 este amplificat de amplificatorul A şi se aplică apoi pe plăcile "verticale" ale osciloscopului. Pe ecranul acestuia va apare semnalul RMN sub forma unui pic (sau mai multe picuri). În loc de osciloscop se poate utiliza un înregistrator în care caz semnalul RMN va apare înscris pe o hârtie.

În prezent se studiază o mare varietate de nuclee prin fenomenul RMN cum ar fi protonii, nucleele ^{19}F (care au momente magnetice relativ mari) şi în special ^{13}C şi ^{31}P. Aplicaţiile fenomenului RMN la aceste nuclee se bazează pe faptul că poziţia semnalului RMN (în scara B, de exemplu) depinde de combinaţia chimică în care se află acel nucleu, adică de norul electronic care îl înconjoară. Acest nor are o acţiune de ecranare (de modificare) a câmpului magnetic aplicat. Din această cauză are loc o aşa-numită deplasare chimică a semnalului RMN, faţă de semnalul nucleului liber, în funcţie de atomii cu care se leagă. Pe

de altă parte înălţimea semnalului RMN ("înălţimea" picului) este proporţională cu concentraţia acelor nuclee din probă. Aceste date sunt utile atât la efectuarea unor analize calitative cât şi a unora cantitative, cum vom vedea mai jos.

XI. 2. Deplasarea chimică şi structura moleculară.

În general ecranarea unui nucleu poate fi redată printr-un parametru σ care exprimă modificarea câmpului exterior B: δB = -σB, σ purtând denumirea de constantă de ecranare. S-a luat semnul (–) deoarece câmpul exterior este de obicei micşorat, astfel încât asupra nucleului va acţiona de fapt un câmp local (sau efectiv) egal cu:

$$B_{loc} = B + \delta B = (1-\sigma)B.$$

În acest caz frecvenţa Larmor va fi:

$$\nu_L = \frac{\gamma B_{loc}}{2\pi} = (1-\sigma)\frac{\gamma B}{2\pi}.$$

Această frecvenţă este diferită pentru nuclee situate în diferite vecinătăţi, cum se întâmplă într-o moleculă. Deci diferite nuclee, chiar ale aceluiaşi element (de aceeaşi natură) intră în rezonanţă la frecvenţe diferite (presupunând B constant). Dacă se menţine însă ν constant, ca şi în cazul spectrometrului discutat anterior, se vor obţine diferite picuri pentru aceste nuclee (de acelaşi fel) în funcţie de σ. Deci în acest fel se manifestă deplasarea chimică. Pentru exemplificare, în fig. 4 se prezintă spectrul ^1H-RMN al alcoolului etilic.

Deoarece deplasarea chimică nu poate fi, practic, măsurată raportându-ne la nucleele libere, aceasta se măsoară în raport cu poziţia semnalului RMN al unui compus standard, care poate fi introdus în prealabil în aparat (standard extern) sau dizolvat în probă (standard intern).

Deplasarea chimică se exprimă cantitativ prin parametrul adimensional δ, definit prin oricare din următoarele expresii:

$$\delta(ppm) = (\sigma_{ref} - \sigma)\cdot 10^6,$$

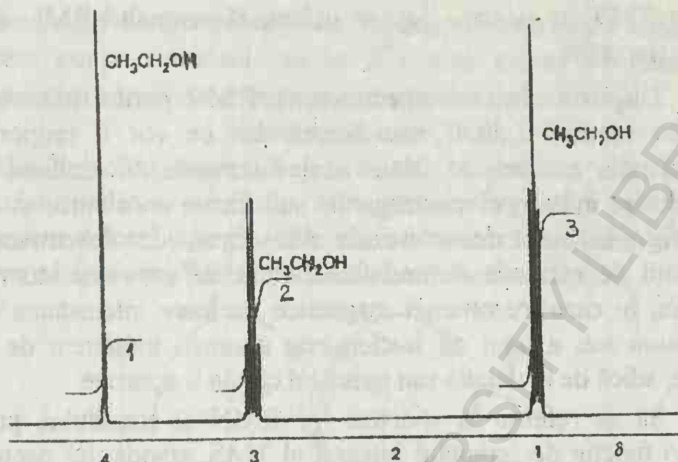


Fig. 4. Spectrul ^1H-RMN al alcoolului etilic. Literele îngroşate desemnează protonii care conduc la maximul de rezonanţă, iar curba cu inflexiune este semnalul integrat.

în funcţie de constanta de ecranare,

$$\delta(ppm)=\frac{\nu-\nu_{ref}}{\nu_{ref}}\cdot 10^6,$$

când se utilizează câmpul B constant, şi :

$$\delta(ppm)=\frac{B_{ref}-B}{B_{ref}}\cdot 10^6,$$

când spectrul RMN se obţine la frecvenţa constantă ν_0 a câmpului oscilant B_1.

Exprimarea lui δ se face în părţi pe milion (ppm) deoarece s-a introdus factorul 10^6, altfel ar fi rezultat nişte mărimi foarte mici.

Valoarea lui δ este independentă de câmpul magnetic, respectiv de frecvenţă şi chiar de aparatul folosit.

Standardul pentru protoni este molecula de tetrametilsilan: $Si(CH_3)_4$ (TMS), mai exact protonii din această moleculă care dau toţi un singur semnal (adică ei sunt echivalenţi, cum vom vedea mai jos). Pentru nucleul ^{13}C ca semnal de referinţă se utilizează acela al nucleului

^{13}C din TMS iar pentru ^{31}P se utilizează semnalul RMN al ^{31}P din H_3PO_4 (aq. 85%).

Dispozitivele unui spectrometru RMN permit măsurarea ariilor diverselor semnale („linii" sau benzi), arii ce vor fi proporţionale cu numărul de nuclee ce dau acele semnale. Rezultatul integrării semnalelor se indică pe spectrogramă sub forma unor curbe cu inflexiuni, ca în fig. 4. Spre deosebire de alte tipuri de spectroscopii, unde coeficienţii de extincţie depind foarte mult de structura atomului sau a moleculei, în cazul rezonanţei magnetice nucleare intensitatea semnalului unui proton sau a unui alt nucleu este aceeaşi, indiferent de gradul de ecranare, adică de molecula sau radicalul căruia îi aparţine.

Să ne referim la spectrul ^{1}H-RMN al etanolului, prezentat în fig. 4. În funcţie de semnalul integrat al TMS, standardul pentru protoni, ce are 12 protoni echivalenţi, se poate stabili pentru fiecare din cele trei semnale (de la $\delta = 1{,}3$ şi 4) numărul de protoni implicaţi. Acest număr s-a trecut, pe fig. 4, în dreptul semnalului integrat.

În felul acesta se poate evalua numărul total de protoni ai unei molecule căreia i se cunoaşte masa molară (vezi şi XI.5), fapt ce are o deosebită valoare analitică, întrucât permite identificarea unui compus prezent într-o probă.

Pentru protoni marea majoritate a semnalelor RMN au valori δ pozitive indicând că valorile σ sunt inferioare celor ale TMS; ele se situează de regulă în domeniul 0–10 ppm. Pentru alte nuclee domeniul de variaţie a deplasărilor chimice uzuale este mai larg: 0–500 ppm pentru ^{19}F, 0–900 ppm pentru ^{15}N; 0–400 ppm pentru ^{13}C. Aceasta indică o dependenţă pronunţată a deplasărilor chimice de structura moleculară, ceea ce sporeşte valoarea analitică a metodei.

În continuare vom analiza, pe scurt, originea constantelor de ecranare. Calculul acestor constante este o problemă foarte dificilă deoarece necesită informaţii detaliate asupra distribuţiei densităţii electronice în starea fundamentală şi excitată a moleculei precum şi asupra energiilor de excitare.

Din volumul mare de date empirice acumulate s-a tras concluzia că σ poate fi scrisă ca suma a trei contribuţii:

$$\sigma = \sigma(\text{loc}) + \sigma(\text{moleculă}) + \sigma(\text{solvent}).$$

Contribuţia locală σ(loc) este în esenţă contribuţia electronilor atomului care conţine nucleul studiat. Ea este suma unei contribuţii diamagnetice σd şi a unei contribuţii paramagnetice σp:

$$\sigma(loc)=\sigma_d(loc)+\sigma_p(loc).$$

Contribuţia diamagnetică provine din distribuţia electronică în starea fundamentală a atomului. Circulaţia electronilor şi precesia Larmor a momentelor magnetice electronice creează un câmp magnetic care se opune câmpului aplicat şi deci ecranează nucleul (fig. 5).

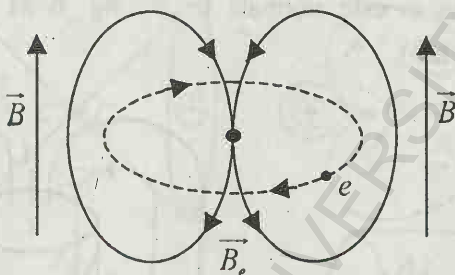


Fig. 5. Ecranarea nucleului datorită „circulaţiei" electronului în jurul nucleului $\left(B_{loc}=B-B_e\right)$.

Contribuţia diamagnetică este singura contribuţie în atomii liberi cu înveliş închis. Ea este de asemenea singura contribuţie la ecranarea locală pe distribuţii de sarcină care au simetrie sferică sau cilindrică. Contribuţia diamagnetică este practic proporţională cu densitatea electronică a atomului ce conţine nucleul de interes. Rezultă că ecranarea scade dacă densitatea electronică pe atom se reduce ca urmare a influenţei unui atom electronegativ din apropiere.

Contribuţia paramagnetică σ_p (având valoare negativă) provine din capacitatea câmpului aplicat de-a forţa electronii să circule prin moleculă folosind orbitalii neocupaţi în starea fundamentală. Ea este zero în atomii liberi şi în jurul axelor moleculelor liniare (ca HC≡CH) unde electronii pot circula liberi, iar un câmp aplicat în jurul axei internucleare este incapabil să-i deplaseze pe alţi orbitali.

Mărimea contribuţiei paramagnetice depinde de uşurinţa cu care câmpul aplicat poate promova electroni în orbitali neocupaţi. Deci ea este invers proporţională cu separarea de energie dintre cel mai înalt orbital

ocupat al moleculei şi orbitalul vacant cel mai coborât. S-a găsit că pentru alţi atomi, afară de hidrogen, contribuţia paramagnetică este contribuţia locală dominantă.

Contribuţia moleculară (sau a grupelor învecinate acelui nucleu) provine din curenţii induşi de B în grupele vecine atomilor. Efectul oricărui fel de curent (diamagnetic sau paramagnetic) este de-a ecrana sau dezecrana nucleul, în funcţie de poziţia relativă a nucleului faţă de grupele învecinate. Să luăm ca exemplu molecula de acetilenă în două situaţii – când axa ei este normală la $\vec{B}$, fig. 6 a), şi când axa este paralelă cu $\vec{B}$, fig. 6 b).

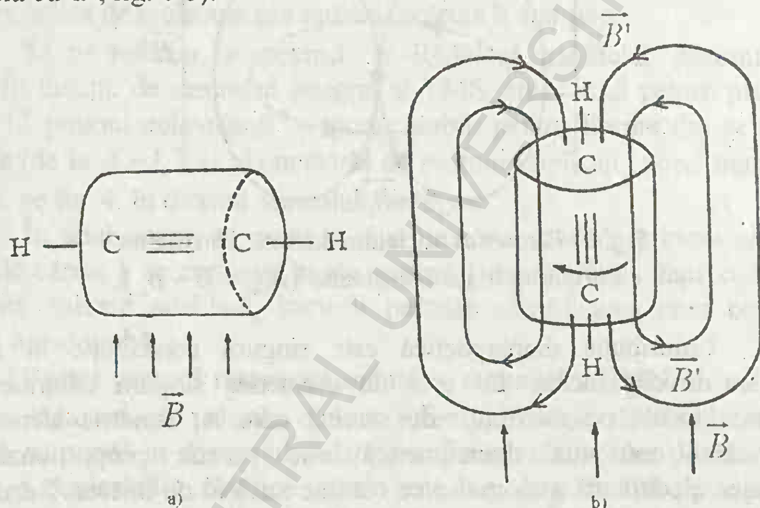


Fig. 6. Moleculă de acetilenă plasată într-un câmp magnetic a) axa moleculei este normală la $\vec{B}$; b) axa moleculei este paralelă cu $\vec{B}$.

Dacă în orientarea a) nu apare nici o circulaţie diamagnetică electronică şi deci nici un efect asupra ecranării protonilor, în orientarea b) circulaţia diamagnetică electronică are ca efect apariţia câmpului magnetic local $\vec{B'}$ care, în regiunea celor 2 protoni ai moleculei, se opune câmpului magnetic exterior, producând o ecranare semnificativă. Întrucât în probă moleculele îşi schimbă rapid orientarea, spre exterior se percepe un efect pozitiv de ecranare, mediat după cele două orientări posibile

(δ=2,36).

Studiul diferitelor grupe de atomi, efectuat atât teoretic prin metode cuantice cât şi experimental prin cercetarea diferitelor spectre RMN, a permis tragerea unor concluzii asupra efectelor de ecranare a diferitelor grupe cercetate. Astfel în cazul legăturii triple C≡C s-a arătat că un efect de ecranare (notat cu +) apare la protonii situaţi în conurile având axa identică cu axa legăturii iar un efect de dezecranare (-) la protonii din afara acestora (fig. 7 a)).

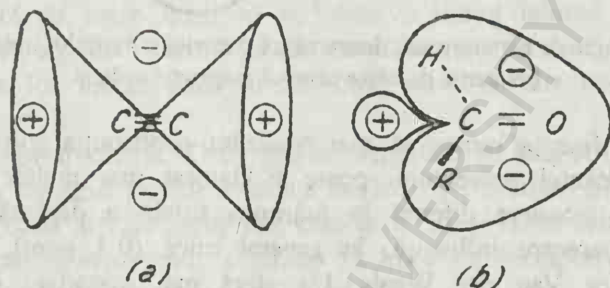


Fig. 7. Zone de ecranare (+) şi dezecranare (-) produse de diferite grupe de funcţionale: tripla legătură (a); gruparea carbonil (b).

Situaţia în cazul grupei carbonil este prezentată în fig. 7b.

Un caz special de efect al unei grupe învecinate se întâlneşte la compuşii aromatici. Anizotropia puternică a susceptibilităţii magnetice a inelului benzenic este atribuită capacităţii câmpului de a induce un curent prin inel, deci o circulaţie a electronilor în jurul inelului, când $\vec{B}$ este perpendicular pe planul moleculei. Datorită câmpului magnetic creat de acest curent protonii din planul ce conţine inelul vor fi dezecranaţi, dar orice grupări situate deasupra sau dedesubtul planului (cum sunt substituenţii inelului) vor fi ecranate.

Grupele învecinate pot avea şi un efect electric indirect asupra deplasării chimice pentru că o grupă polară dintr-o moleculă poate conduce la un câmp electric care deformează distribuţia electronică în apropierea unui nucleu.

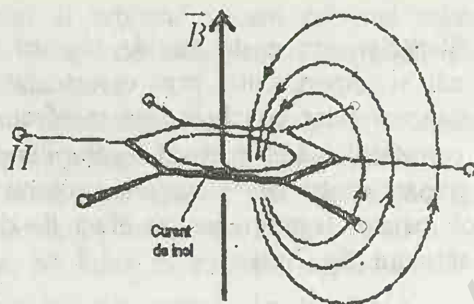


Fig. 8. Efecte de ecranare sau dezecranare datorită curentului indus în inelul benzenic de către câmpul magnetic aplicat.

În fine, a rămas să mai analizăm contribuția solventului. S-a arătat că efectul solventului poate fi datorat mai multor factori, ce intervin cu pondere diferită în mărimea totală a deplasării chimice. Astfel, o oarecare influență, în general mică (0,1 ppm), se atribuie interacțiunilor Van der Waals. Un efect mai important poate apare datorită anizotropiei diamagnetice a solventului. De exemplu moleculele de benzen (folosit drept solvent) având formă de disc vor îndrepta spre solvit în special regiunea mare de deasupra şi dedesubtul inelului şi numai în mică măsură planul inelului, astfel că curentul de inel va produce ecranarea considerabilă a protonilor situați deasupra şi dedesubtul său.

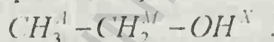
Un alt factor, de cea mai mare importanță în influențarea deplasărilor chimice, este posibilitatea formării unor complecşi sau asociații moleculare prin interacțiuni specifice dintre moleculele de solvent şi cele de solvit (legături de hidrogen sau interacțiuni prin transfer de sarcină). În practica de laborator sunt importante legăturile de hidrogen în cazul compuşilor ce conțin grupe OH şi COOH. În general când un proton este inclus în legături de hidrogen, deplasarea sa chimică se manifestă la un câmp mai mic (δ mai mare) decât la protonii nelegați.

Utilizarea unui solvent ce dă legătură de H cu o anumită grupare a moleculei va face ca semnalul RMN al protonului din acea grupare să sufere o deplasare mai mare, decât în lipsa legăturii. Acest lucru poate ajuta la interpretarea spectrului RMN, mai ales în cazul când semnalele diverşilor protoni sunt foarte apropiate.

XI. 3. Structura fină a spectrelor RMN.

Analiza spectrelor RMN de înaltă rezoluție (la câmpuri B, respectiv frecvențe ν, mari) arată că semnalul unor nuclee echivalente chimic (definirea acestora este dată mai jos) nu este o simplă linie ci un grup de semnale (linii), adică un multiplet. În fig. 4 se observă acest lucru în cazul etanolului. (Trebuie de precizat faptul că rezoluția spectrometrului RMN la care a fost înregistrat spectrul alcoolului nu a fost suficient de mare încât să se observe întreg tabloul de linii de structură fină, ața cum rezultă el din considerațiile de mai jos). Această scindare are loc numai dacă în moleculă există și alte nuclee diferite chimic de primele.

În spectrometria RMN literele depărtate în alfabet (de exemplu A și X) se folosesc pentru a indica nuclee cu deplasări chimice foarte diferite, pe când literele apropiate, cum ar fi A și B, se folosesc pentru nuclee cu deplasări chimice similare. Să luăm ca exemplu molecula de alcool etilic, având protoni de tipul A, M și X :



$$CH_3^A - CH_2^M - OH^X \ .$$

Aceasta înseamnă că protonii grupei CH_3 vor prezenta deplasări chimice mult diferite față de protonul grupei OH, diferența fiind mai mică pentru protonii grupei CH_2.

Explicarea scindării unuia din semnale, de exemplu cel al protonului hidroxil (notat cu X) poate fi generalizată și pentru celelalte (sau alte) semnale. Se poate spune că protonul X simte în realitate un câmp magnetic datorat nu numai câmpului $\vec{B}$ (static) și ecranării electronice, ci și câmpurilor magnetice create de celelalte nuclee magnetice din moleculă, în primul rând de cei doi protoni metilen (notați cu M).

Într-o primă versiune explicativă se poate considera că, în raport cu câmpul magnetic static, spinii celor doi protoni M au trei stări posibile: starea în care ambii spini sunt paraleli cu $\vec{B}$, deci suma numerelor cuantice magnetice este : $\sum m_M = 1$; starea în care un spin este paralel iar celălalt antiparalel cu $\vec{B}$, deci : $\sum m_M = 0$ și starea în

care ambii spini sunt antiparaleli cu B, deci : $\sum m_M = -1$.

Aceste stări se notează cu $\alpha\alpha, \alpha\beta + \beta\alpha$ şi $\beta\beta$. Dacă considerăm ponderea relativă a stărilor $\alpha\alpha$ şi $\beta\beta$ egală cu unitatea (1), ponderea relativă a stării $\alpha\beta + \beta\alpha$ va fi egală cu 2.

Dacă b_M este câmpul magnetic creat la nucleul X de către unul din nucleele M, în cazul când acesta se află în starea α, valorile posibile ale câmpului magnetic simţit de nucleul X vor fi: $2b_M$, 0 şi $-2b_M$, fiecare corespunzând stărilor posibile ale spinilor M. Aceasta înseamnă că fiecare din cele două nivele Zeeman ale nucleului X se va scinda în trei subnivele, se vorbeşte de o scindare datorită cuplajului spin – spin (Evident că se neglijează câmpul creat de nucleele A în locul unde se află nucleele X).

Se arată că energia suplimentară a nucleului X datorită cuplajului spin – spin cu alte nuclee echivalente (de exemplu de tip M) este:

$$\Delta E = -hJ_{XM} m_X \sum m_M ,$$

unde : $J_{XM} = \left|\frac{2b_M \gamma}{2\pi}\right|$ se numeşte constantă de cuplaj, mărimea ei nu depinde de intensitatea câmpului magnetic static.

Dacă se mai ţine seama şi de regula de selecţie $\Delta M_I = \pm 1$, M_I fiind numărul cuantic magnetic total (datorat atât nucleului X cât şi celor două nuclee M) vor rezulta trei tranziţii ca în fig. 9.

Frecvenţele celor trei linii RMN ale nucleului X vor fi:

$$\nu_X^1 = \nu_X^0 - J_{XM}, \quad \nu_X^2 = \nu_X^0, \quad \nu_X^3 = \nu_X^0 + J_{XM},$$

iar intensităţile relative ale acestor linii vor fi proporţionale cu ponderile stărilor $m_M m_M$, adică vor fi în raportul 1:2:1.

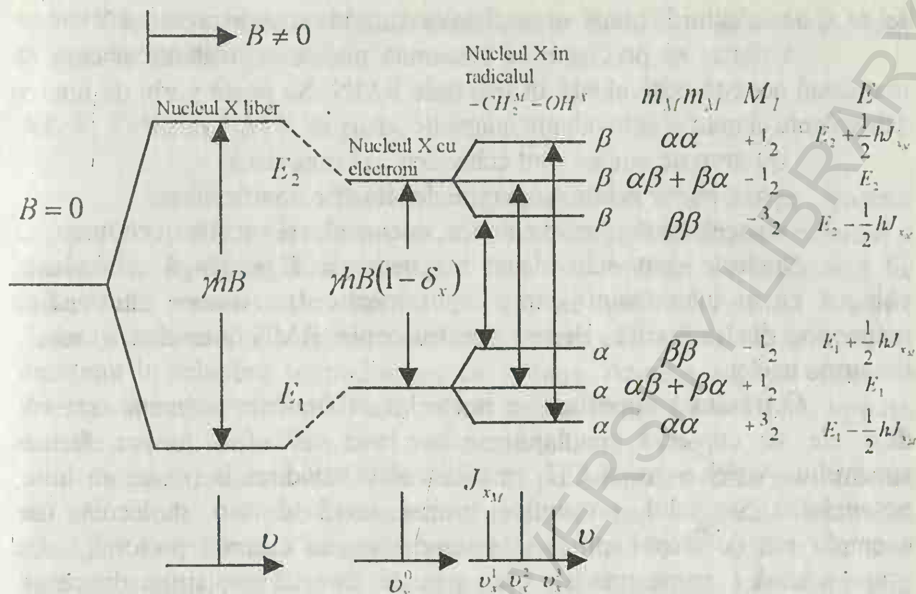


Fig. 9. Explicarea structurii fine a liniei corespunzătoare protonului X al radicalului -OH al alcoolului etilic.

Pe o cale similară se poate arăta că datorită nucleului X, semnalul nucleelor M se scindează într-un dublet cu linii egale şi separate prin $J_{MX} = J_{XM}$, întrucât $|b_X| = |b_M|$. Semnalul M apare însă format din 8 linii deoarece fiecare din aceste două linii se scindează în 4 linii datorită celor patru valori posibile ale câmpului magnetic creat de cei trei protoni de tip A (vezi tabelul de mai jos).

Număr de nuclee	Valorile posibile ale lui $\sum m$	Notaţia stării respective	Ponderea relativă a stării
3	+3/2 +1/2 -1/2 -3/2	ααα ααβ+αβα+βαα αββ+βαβ+ββα βββ	1 3 3 1

În fine, semnalul nucleelor A se va scinda în trei componente, la

fel ca şi a nucleului X (dacă se neglijează câmpul creat de protonul X).

A rămas să precizăm ce înseamnă nuclee echivalente şi cum se manifestă această echivalenţă în spectrele RMN. Se poate vorbi de nuclee echivalente chimic şi echivalente magnetic.

Un grup de nuclee sunt echivalente chimic dacă:

- sunt legate printr-o operaţie de simetrie a moleculei,
- au aceleaşi deplasări chimice, deci aceleaşi vecinătăţi chimice.

Nucleele sunt echivalente magnetic dacă pe lângă echivalenţa chimică au şi interacţiuni spin – spin identice cu oricare alte nuclee magnetice din moleculă. Pentru spectroscopia RMN interesează aceste din urmă nuclee.

O trăsătură importantă a nucleelor echivalente magnetic este că, deşi ele se cuplează, cuplajul nu are nici un efect asupra formei spectrului. Astfel o grupă CH_3 (metil) izolată conduce la o singură linie, nescindată. Semnalul protonilor grupei metil dintr-o moleculă (de exemplu cea de alcool etilic) este scindat numai datorită protonilor din grupa vecină (grupa metilen CH_2) nu şi datorită cuplajului dintre ei. Motivul pentru această nesesizare a cuplajului este că toate tranziţiile permise ale spinilor nucleari sunt reorientări colective ale grupelor de spini nucleari echivalenţi, care nu modifică orientările relative ale spinilor în cadrul grupei. Ca exemplu vom da tot grupa metil (fig. 10).

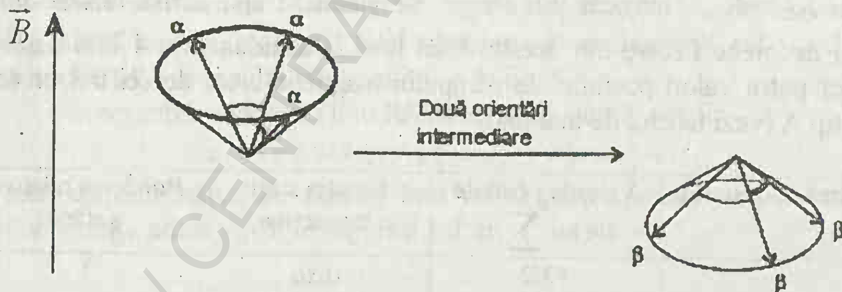


Fig. 10. Acţiunea câmpului magnetic asupra unei grupe cu trei nuclee echivalente.

Această grupă se orientează în câmpul $\vec{B}$ fără variaţia unghiului dintre spini, când are loc o absorbţie de rezonanţă. Întrucât ea se

comportă ca un singur nucleu, cuplajul spin – spin între spinii individuali ai grupei este nedetectabil.

XI. 4. Tehnici RMN în puls.

Spectrometria RMN de tip clasic se bazează pe iradiere continuă cu unde radio a probei. De exemplu, prin variaţia uniformă a frecvenţei, la câmp B constant, se face ca condiţia de rezonanţă fie îndeplinită succesiv de diferite nuclee ale probei. Această variaţie (baleiaj) trebuie să fie suficient de lentă pentru ca sistemul de spini să fie menţinut în echilibru termodinamic cu reţeaua. Aceasta implică viteze de baleiaj de ordinul 0.1–10 Hz/s, adică durata de obţinere a unui spectru este de ordinul $10^2 - 10^3$ s, deci o eficienţă scăzută.

Spectrometria RMN modernă în pulsuri se bazează pe iradierea cu unde radio în pulsuri scurte şi intense, care determină realizarea condiţiei de rezonanţă simultan pentru toate tipurile de nuclee ale unui anumit izotop. Acest mod de operare este cunoscut sub denumirea prescurtată PFT (puls şi transformată Fourier – vezi mai jos).

Fiecare din aceste pulsuri este o undă dreptunghiulară care poate fi considerată ca o suprapunere de oscilaţii sinusoidale de frecvenţe şi amplitudini diferite. Ca urmare, pulsurile scurte, obţinute prin cuplarea şi decuplarea periodică a unui oscilator radio având frecvenţa ν_0, echivalează cu o undă conţinând toate frecvenţele din domeniul $\nu_0 \pm \Delta\nu$, $\Delta\nu$ fiind intervalul de frecvenţe al oscilaţiilor care compun unda dreptunghiulară şi care este legat de durata, t_p, a pulsurilor prin relaţia:

$$t_p = \frac{1}{\Delta \nu}.$$

O astfel de iradiere a probei face ca toate tipurile de nuclee ale probei să găsească în componenta pulsului frecvenţa pentru care este îndeplinită condiţia de rezonanţă (cu condiţia ca t_p să fie potrivit ales).

Înainte de-a vedea ce se întâmplă cu spinii nucleari după aplicarea pulsului să mai analizăm o serie de mărimi caracteristice fenomenului RMN. Pentru simplificarea discuţiilor ne vom referi în continuare la un ansamblu de protoni (adică la fenomenul ^1H - RMN).

În absenţa câmpului magnetic, momentele $\vec{\mu}$ ale protonilor

(având I=1/2) vor avea orientări aleatorii iar populațiile celor două nivele de energie (cu m_I =1/2 și m_I= -1/2) vor fi egale. Introducerea unui astfel de ansamblu de spini într-un câmp magnetic $\vec{B}$ va produce o distribuție inegală a spinilor între cele două stări. Dacă notăm cu N_2 și N_1 populațiile nivelului pentru care m_I =+1/2 (de energie înaltă), respectiv a celui pentru care m_I= -1/2 (de energie joasă) atunci, la echilibru, raportul lor se va stabili în conformitate cu legea de distribuție Maxwell – Boltzmann:

$$\frac{N_2}{N_1} = e^{-\frac{\Delta E}{kT}}, \ \Delta E = 2\mu B,$$

adică:

$$\frac{N_2}{N_1} = e^{-\frac{2\mu B}{kT}} \cong 1 - \frac{2\mu B}{kT}.$$

Astfel, în starea favorizată energetic apare un exces de populație egal cu $\frac{2\mu B}{kT}$ al cărui efect este apariția unei magnetizări microscopice $\vec{M}$; $\vec{M}$= vector de magnetizare , rezultanta compunerii vectorilor elementari $\vec{\mu}$ el fiind este orientat pe direcția lui $\vec{B}$ - fig. 11 a).

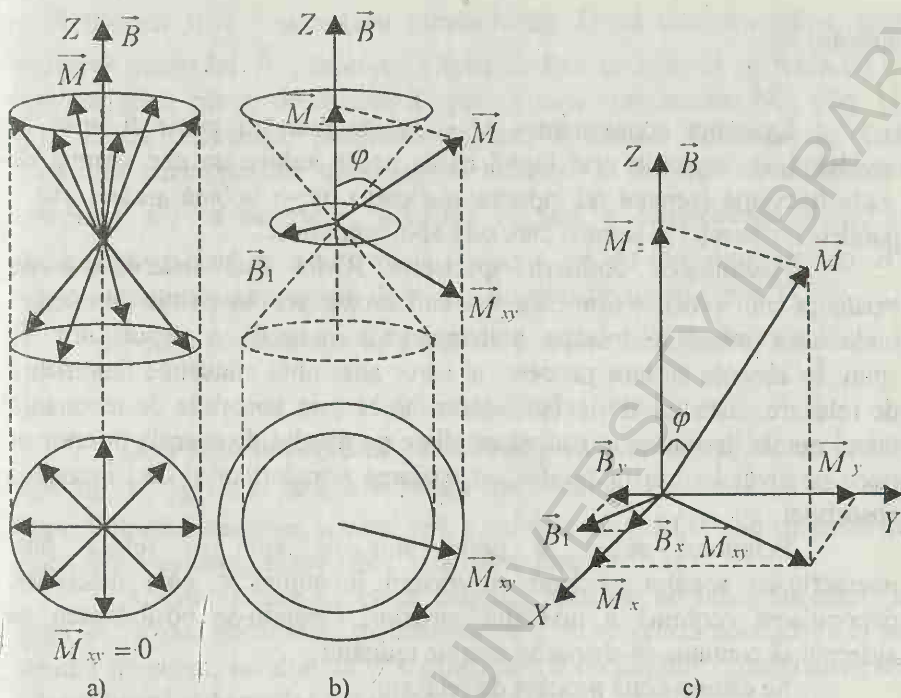


Fig. 11. a) Ansamblu de protoni plasați într-un câmp magnetic $\vec{B}$; b) acțiunea simultană, asupra protonilor, a câmpurilor $\vec{B}$ și $\vec{B}_1$ $(\vec{B}_1 \perp \vec{B})$; c) orientarea reciprocă a vectorilor $\vec{B}$, $\vec{B}_1$ și $\vec{M}$, la un anumit moment de timp.

Aplicarea câmpului perturbator $\vec{B}_1$, de frecvență ν, are două efecte:

a) unele din nuclee, orientate în sensul câmpului, vor absorbi energie și își vor schimba orientarea, scăzând excesul de populație al stării favorizate,

b) nucleele (spinii) vor fi obligate să precesioneze în fază, odată cu vectorul $\vec{B}_1$, ceea ce are drept consecință apariția unei componente $\vec{M}_{XY}$ a magnetizării care se rotește în planul xy : fig. 11 b).

Vectorul $\vec{M}$ încetează de-a mai fi coliniar cu $\vec{B}$ fiind rotit în afara axei z cu un unghi φ, care depinde de mărimea lui $\vec{B}_1$ și de durata t_p a

aplicării lui:

$$\varphi = \gamma B_1 t_p .$$

Existenţa componentei $\overrightarrow{M}_{XY}$ a magnetizării poate fi pusă în evidenţă, de exemplu prin faptul că ea poate induce un mic semnal de radiofrecvenţă (semnal de inducţie nucleară) într-o bobină a cărei axă e paralelă cu direcţia y, semnal care este apoi amplificat.

Posibilitatea obţinerii spectrelor RMN este determinată de existenţa unor procese prin care sistemul excitat prin absorbţie de energie tinde să-şi refacă distribuţia boltzmanniană normală a populaţiilor de spini. În absenţa acestor procese, al căror ansamblu constituie fenomenul de relaxare, sistemul ar deveni saturat, adică prin absorbţia de rezonanţă micul număr de nuclee excedentare aflate pe nivelul de energie inferior ar trece pe nivelul superior producând egalarea populaţiilor şi deci încetarea absorbţiei.

Echilibrul iniţial al populaţiilor de spin se reface prin interacţiunea spinilor nucleari cu mediul înconjurător, care determină depopularea continuă a nivelului superior, creându-se posibilitatea ca sistemul să continue să absoarbă energie radiantă.

Se disting două procese de relaxare:

a) Relaxarea spin – reţea (sau longitudinală) care constă în revenirea la valoarea iniţială a componentei $\overrightarrow{M}_Z$ a magnetizării microscopice $\overrightarrow{M}$, adică restabilirea orientării iniţiale a spinilor (în câmpul $\overrightarrow{B}$) pe care câmpul $\overrightarrow{B}_1$ i-a obligat să-şi schimbe sensul. Legea de variaţie a lui M_Z cu timpul este de forma:

$$M_Z(t) - M_0 \approx e^{-\frac{t}{T_1}},$$

unde : M_0 = valoarea de echilibru a magnetizării după direcţia lui $\overrightarrow{B}$ iar: T_1 = timpul de relaxare spin – reţea.

În mecanismul relaxării longitudinale intervine interacţiunea spinilor nucleari cu câmpurile magnetice fluctuante produse de mişcările termice ale nucleelor învecinate: vibraţiile reţelei în solide sau mişcarea moleculară în lichide şi gaze. Atunci când aceste câmpuri au componente a căror frecvenţă este egală cu cea a precesiei nucleelor considerate, are loc un transfer de energie între spini şi mediu.

b) Relaxarea spin – spin (sau transversală). După cum s-a arătat, prin aplicarea câmpului $\overrightarrow{B}_1$, dipolii nucleari au fost obligaţi să se rotească în fază cu acest câmp, determinând apariţia unei componente M_{xy} (fig. 11 c)). După rezonanţă, pierderea treptată a acestei coerenţe de fază (datorită interacţiunilor dintre spinii nucleari şi datorită neomogenităţii câmpului $\overrightarrow{B}$) va determina scăderea treptată a componentei $\overrightarrow{M}_{xy}$, în consecinţă unghiul φ scade treptat la zero, iar $\overrightarrow{M}$ ajung coliniar cu $\overrightarrow{B}$. Acest proces este caracterizat de timpul de relaxare transversală T_2.

Pentru componenta $\overrightarrow{M}_y$ a lui $\overrightarrow{M}_{xy}$ există următoarea legitate:

$$M_Y(t) = M_0 \cos(2\pi \nu_L t) e^{-\frac{t}{T_2}}.$$

Deci semnalul detectat pe direcţia y va avea o scădere oscilantă : vezi fig. 12 ; $g(t)$,de pe axa verticală fiind semnalul de inducţie nucleară într-o bobină detectoare, a cărei axă e paralelă cu axa OY. Se vorbeşte de o scădere a inducţiei libere (free induction decay =FID).

Aceasta înseamnă că la sfârşitul aplicării pulsului, sistemul de spini se va găsi într-o stare de neechilibru şi se va relaxa conducând la un semnal tranzient, rezultat ca o suprapunere a oscilaţiilor caracteristice ale tuturor tipurilor de nuclee ale probei (semnalul FID total).

După cum s-a văzut mai sus, în cazul când există un singur tip de nuclee (deci când există o singură frecvenţă de rezonanţă), FID are forma unei oscilaţii sinusoidale amortizate. Dacă spectrul conţine mai multe frecvenţe , semnalul FID apare foarte complicat. Decodificarea acestuia, adică transformarea sa din forma g(t) într-o funcţie de frecvenţă g(ν), forma uzuală de prezentare a spectrelor RMN, se face folosind transformata Fourier.

S-a dovedit că FID şi spectrul RMN sunt una transformata Fourier a celeilalte. Forma semnalului g(t) este de tipul:

$$g(t) = k \int_{-\infty}^{+\infty} g(\nu) e^{2\pi i \nu t} d\nu = k \int_{-\infty}^{+\infty} g(\nu)[\cos(2\pi \nu t) + i \sin(2\pi \nu t)] d\nu$$

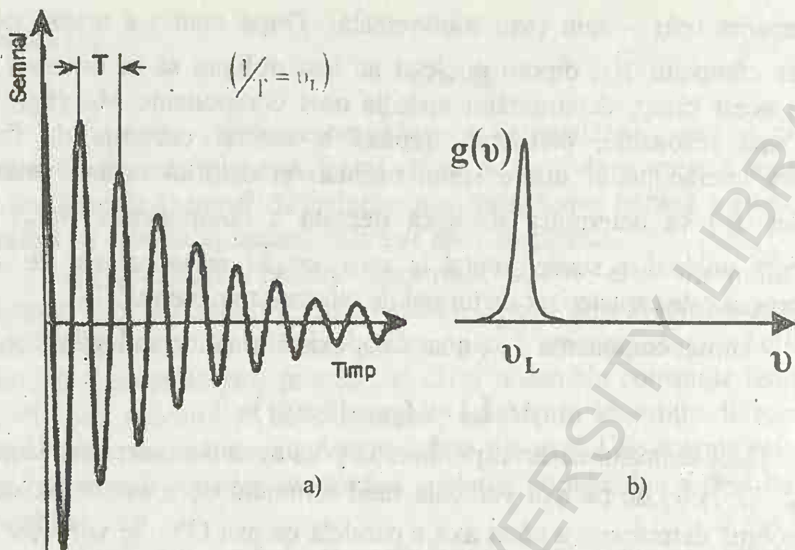


Fig. 12. a) Scăderea liberă a inducției unei probe de spini cu o singură frecvență de rezonanță, b) Spectrul RMN corespunzător.

Transformata Fourier a lui g(t) conține şi spectrul de absorbție şi cel de dispersie, componenta de absorbție fiind:

$$g(\nu)_{abs} = k\int_{0}^{\infty} g(t)\cos(2\pi\nu t)dt\ .$$

Operația de decodificare, adică "extragerea" frecvențelor de rezonanță din FID, se face cu ajutorul unui calculator ataşat spectrometrului RMN.

XI.5. Analiza calitativă şi cantitativă utilizând spectrele RMN.

Spectrele RMN singure, la fel ca cele IR, Raman sau cele moleculare din UV-VIS, nu permit determinarea certă a structurii chimice a unui anumit compus. Pentru astfel de determinări trebuie corelate datele obținute prin înregistrarea diferitelor tipuri de spectre, fiind necesară, de asemenea, cunoaşterea unor constante fizico-chimice

ale acelui compus .

Pentru a se obține informații rapide despre posibila structură moleculară a compusului cercetat se apelează la date cum sunt cel prezentate în fig. 13 a) și 13 b), unde se dau câteva deplasări chimice tipice pentru proton $\left({}^{1}H\right)$ și nucleul ${}^{13}C$, în funcție de radicalul molecular din care fac parte aceste nuclee.

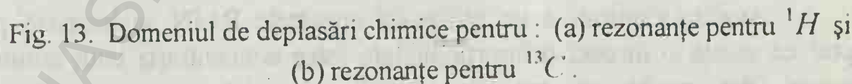


Fig. 13. Domeniul de deplasări chimice pentru : (a) rezonanțe pentru ${}^{1}H$ și (b) rezonanțe pentru ${}^{13}C$.

Mai jos dăm un exemplu despre modul cum se interpretează

spectrul ^1H-RMN al unui compus necunoscut, şi anume spectrul prezentat în fig. 14, pentru a vedea ce informaţii se pot obţine dintr-un astfel de spectru.



Fig. 14. Spectrul ^1H -RMN al unui compus supus analizei.

Conform datelor din fig. 13 a rezonanţa (semnalul) de la $\delta = 3,4$ corespunde grupării CH_2 dintr-un eter, iar cea de la $\delta = 1,2$ corespunde grupării CH_3 din CH_3CH_2. Structura fină a grupei CH_2 (un cvartet 1:3:3:1) este caracteristică scindării produse de CH_3. Structura fină a rezonanţei CH_3 (un triplet) este caracteristică scindării produse de CH_2. Constanta de cuplaj este $J = \pm 6Hz$, aceeaşi pentru fiecare grupă.

Conform datelor de mai sus compusul probabil este $(CH_3CH_2)_2O$.

Analiza cantitativă ce utilizează spectrele RMN se bazează pe faptul că există o directă proporţionalitate între concentraţia unui anumit compus din probă şi mărimea (aria) semnalelor corespunzătoare nucleelor ce dau acele semnale. (^1H, ^{13}C, ^{15}N etc).

Pentru determinarea cantității unui anumit compus dintr-o probă, cu structură chimică cunoscută (G_{comp}) se introduce în acea probă a cantitate cunoscută (G_{etalon}) a unei substanțe pure, ce dă un semnal RMN caracteristic (etalon intern). Din spectrul RMN al acestui amestec se determină ariile corespunzătoare unui anumit semnal al compusului de determinat (A_{comp}) şi unui anumit semnal al etalonului (A_{etalon}). Dacă se înregistrează spectrul ^1H -RMN se va utiliza relaţia:

$$G_{comp} = G_{etalon} \frac{M_{comp}}{M_{etalon}} \frac{n_{H\ etalon}}{n_{H\ compus}} \frac{A_{comp}}{A_{etalon}},$$

unde M_{comp} şi M_{etalon} reprezintă masele moleculare corespunzătoare, iar $n_{H\ etalon}$ şi $n_{H\ compus}$ - numărul de protoni responsabili de semnalul RMN studiat - la etalon şi la probă.

Anexa I. Date relative la compoziția normală a unor lichide biologice.

Tabelul 1. Valori normale ale sângelui „Exprimare curentă".

Densitatea sângelui total	1,056-1,064 g/ml
Densitatea plasmei	1,024-1,028 g/ml
Volumul procentual al hematiilor	38-46%
Hemoglobina	13-18 g/100ml

Substanțe organice (mg%).

Glucoza	70-120 mg/100ml
Corpi cetonici	0,3-0,9
Acid oxibutiric	0,5-3,0 mg/100ml
Acid piruvic	0,5-1,20 mg/100ml
Acid lactic	10-15 mg/100ml
Alcool	0,5 mg/100ml
Proteine totale	6,8-8,7 g/100ml
Albumine totale	4,2-5,6 g/100ml
Globuline totale	1,5-3,00 g/100ml
α – globuline	0,30-0,60 g/100ml
β – globuline	0,55-1,10 g/100ml
γ – globuline	0,65-1,30 g/100ml
Albumine/globuline	1,6-2,5
Fibrinogen	200-600 mg/100ml
α_1 – lipoproteină	290-770 mg%
α_1 – antitripsină	200-400 mg%
β – lipoproteină	290-950 mg%
Ceruloplasmină	20-45 mg%
Haptoglobină	50-220 mg%
α_2 – macroglobulină	150-350 mg%
C_3' – complement	80-140 mg%
Transferina	200-400 mg%
IgG	800-1800 mg%

Substanțe organice, continuare.

IgA	90-450 mg%
IgM	60-250 mg%
Azot total	30-37 mg/100ml
Azot neproteic total	20-40 mg/100ml
Azot rezidual	10-16 mg/100ml
Azot aminic	3-6 mg/100ml
Azot polipeptidic	4-6 mg/100ml
Uree	20-40 mg/100ml
Acid uric	2-5 mg/100ml
Creatinină	1,5-2 mg/100ml
Creatină+creatinină	3-5 mg/100ml
Indican	0,026-0,085 mg/100ml
Bilirubina totală	0,04-1 mg/100ml
Bilirubina directă	0-0,25 mg/100ml
Bilirubina indirectă	0,75 mg/100ml
Colesterol total	220-300 mg/100ml

Substanțe anorganice (mg%).

Cloruri (NaCl) în ser	570-620 mg/100ml
Cloruri (NaCl) în globule	290-330 mg/100ml
Cloruri (NaCl) în plasmă	450-510 mg/100ml
Clor globular/clor plasmatic	0,50-0,55
Fosfor total în ser	7-15 mg/100ml
Fosfor total în sânge total	30-50 mg/100ml
Sodiu în sânge total	170-220 mg/100ml
Sodiu în plasmă sau ser	310-340 mg/100ml
Sodiu în eritrocite	40-130 mg/100ml
Potasiu în ser	18-20 mg/100ml
Potasiu în sânge total	170 mg/100ml
Calciu în sânge total	4,5-6 mg/100ml
Calciu în ser	9-11 mg/100ml
Calciu în eritrocite	0,6-5,9 mg/100ml
Fier seric	70-140 µg/100ml la bărbați 85-100 µg/100ml la femei

Tabelul 2. Valorile normale ale lipidelor şi ale unor produşi rezultaţi din metabolismul lipidic.

Lipide totale	50-700 mg%
Colesterol total	220-300 mg%
Colesterol liber	20-30 mg%
Gliceride	50-150 mg%
Fosfolipide din care: lecitină sfingomielină lizolecitină cefalină	150-220 mg% (5-10 mg% fosfor liposolubil) 66% din totalul de fosfolipide 22% din totalul de fosfolipide 9% din totalul de fosfolipide 3% din totalul de fosfolipide
Acizi graşi totali (din esterii de colesterol , din fosfolipide şi din trigliceride)	150-350 mg% (aproximativ 12mEq/l)
Acizi graşi liberi	12-16 mg% (aproximativ 0,5mEq/l)
Glicerol Corpi cetonici	0,6-1,6 mg% 0,3-0,9 mg%

Alimentele cele mai bogate în colesterol (element structural esenţial al membranelor celulare) sunt de origine animală şi în special sunt următoarele:

	Grăsime porc	Ficat	Unt	Rinichi	Gălbenuş de ou	Creier
mg. Colesterol %g alimente	100	250	300	350	1700	3000

Tabelul 3. Valorile normale ale urinei.

Densitatea:	1,016-1,025
Indice de refracție:	1,3367-1,3465
PH:	5,0-5,8
Clor (exprimat în NaCl):	10-12 g/24 ore
Acid fosforic (P_2O_5):	2-5 g/24 ore
Calciu:	0,07-,03 g/24 ore
Sulf:	0,5 g/24 ore
Azot:	10-15 g/24 ore
Amoniac:	0,6-0,8 g/24 ore
Uree:	25-35 g/24 ore
Acid uric:	0,7 g/24 ore
Indican:	4-5 mg/24 ore după regim mixt
	15-20 mg/24 ore după regim carnat
Creatinină:	1,5 g/24 ore
Corpi cetonici:	50 mg/24 ore

Tabelul 4. Valori comparative ale principalelor componente din LCR și plasmă.

	Plasmă mg%	LCR mg%
Proteine	6300-8500	16-38
Aminoacizi	4,5-9	1,5-3
Creatinină	0,7-2	0,4-2
Acid uric	2,9-6,9	0,5-2,8
Colesterol	100-150	absent
Uree	20-42	5-39
Glucoză	70-120	45-80
Cloruri (ClNa)	560-630	720-750
Fosfat anorganic	2-5	1-2
pH	7,3-7,4	7,3-7,4
Sodiu	325	325
Potasiu	20	12-17
Magneziu	1-3	3-3,6
Calciu	9-11	4-7,6
Acid lactic	10-32	8-27

Bibliografie.

1. L. Ababei, "Biochimie medicală. Lucrări practice", Institutul de Medicină şi Farmacie Iaşi, Iaşi, 1975.
2. P. W. Atkins, C. A. Trap, „Tratat de chimie fizică" (traducere din limba engleză), Ed. Tehnică Bucureşti,1989.
3. N. Avram, „Introducere în spectroscopia Raman", Ed. Facla, Timişoara, 1982.
4. J. Brandmüller, H. Moser, „Einführung in die Ramanspektroskopie", Darmstadt, 1962.
5. A. Butucelea, „Tehnici noi în spectroscopie", Ed. Ştiinţifică şi Enciclopedică, Bucureşti ,1984.
6. D. Bârcă-Gălăţeanu, M. Giurgea, I. Iova, V. Sahini, A. Truţia, R. Ţiţeica, „Introducere în spectroscopia instrumentală", Ed. Tehnica, Bucureşti, 1966.
7. R. J. H. Clark, R. E. Hester (editori), „Biomedical Applications of Spectroscopy", Advances in Spectroscopy, Volume 25, John Wiley&Sons, Chichester, New York, 1996.
8. E. Cordos, C. Manoliu, „Spectrometria de absorbţie şi fluorescenţă atomică", Ed. Academiei R.S.R, Bucureşti, 1984.
9. I. F. Dumitru, „Biochimie", Ed. Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, 1980.
10. M. A Eliaşevici, „Spectroscopia atomică şi moleculară", Ed. Academiei RSR, Bucureşti, 1966.
11. S. Herman, „Aparatura medicală. Principiile fizice ale aparaturii medicale moderne", Ed. Teora, 2000.
12. I. Iova, I. I. Popescu, E. Toader, „Bazele spectroscopiei plasmei", Ed. Ştiinţifică şi Enciclopedică, Bucureşti, 1987.
13. V. G. Iyengar, „Elemental analysis of biological systems", Academic Press, New York,London, 1994.
14. I. I. Laserna (editor), „Modern techniques in Raman spectroscopy", John Wiley&Sons, Chichester, New York, 1996.
15. E. Luca, V. Bărboiu, M. Strat, „Analiza structurală prin metode fizice", vol. I şi II, Ed. Academiei RSR, Bucureşti, 1984.
16. I. S. Lealikov, „Metode fizico-chimice de analiză", Ed. Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, 1963.

17. N. Mitrică-Kondi, „Laboratorul clinic. Biochimie", Ed. Medicală, Bucureşti, 1981.
18. I. G. Murgulescu, V. En. Sabini, „Introducere în chimia fizică, volI,2, Studiul şi proprietăţile moleculelor", Ed. Academiei RSR, Bucureşti, 1978.
19. G. C. Moisil, E. Curatu, „Optică. Teorie şi aplicaţii", Ed. Tehnică Bucureşti. 1986.
20. Al. Nicula, „Rezonanţa magnetică", Ed. Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, 1980.
21. G. Oster, „Physical techniques in biological research" ed. 2-a, Academic Press, New York-London, 1971.
22. R. Otinescu, M. Greabu, „Chemiluminescenţa şi bioluminescenţa", Ed. Tehnică, Bucureşti, 1987.
23. Donald I. Pietrzyk, C. W. Frank, „Chimie analitică" (traducere din limba engleză), Ed. Tehnică, Bucureşti, 1989.
24. I. Pogany, M. Banciu, „Metode fizice în chimia organică", Ed. Ştiinţifică Bucureşti, 1972.
25. C. Pătroescu, I. Gănescu, „Analiza apelor", Ed. Scrisul românesc, Craiova, 1980.
26. I. I. Popescu, F. S. Uliu, „Bazele fizice ale opticii", Ed. Universitaria, Craiova, 1998.
27. V. Pop, „Optică şi Spectroscopie",notiţe de curs, Ed. Universităţii „Al. I. Cuza" Iaşi, 1974.
28. Douglas A. Skoog, „Principles of Instrumental Analysis", Elsevier Science, 1994.
29. M. Strat, V. Spulber, „Introducere în spectroscopia mediilor condensate", Ed. Tehnică, Bucureşti, 1981.
30. Sidney Udenfried, „Fluorescence Assay in Biology and Medicine", Academic Press, New York-London, 1969.
31. I. D. Winefordner (editor), „Spectrochemical Methods of Analysis", Wiley Interscience, New York-London, 1970.
32. A. N. Zaidel, G. V. Ostrovskaia, I. I. Ostrovski, „Tehnica şi practica spectroscopiei", Ed. Ştiinţifică şi Enciclopedică, Bucureşti, 1984.

TIPARUL EXECUTAT LA
IMPRIMERIA EDITURII UNIVERSITĂȚII
„ALEXANDRU IOAN CUZA" DIN IAȘI
6600 Iași, Păcurari 9, tel./fax (0232) 314 947
e-mail: editura_uaic@mail.com

Format: 61×86/16
Coli tipo: 15,25
Apărut: 2002
Comanda: 1.336

